

**Untersuchungen zur selektiven Erkennung
von G-Proteinen durch GPCRs und ihrer
nachgeschalteten Aktivierung mittels
Mutagenesestudien**

Dissertation zur
Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

dem
Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Volker Thorsten Jelinek

aus Gießen

Marburg

2020

Erstgutachter: Prof. Dr. Moritz Bünemann

Zweitgutachter: Prof. Dr. Peter Kolb

Eingereicht am 16.09.2020

Tag der mündlichen Prüfung am 29.10.2020

Hochschulkennziffer: 1180

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Untersuchungen zur selektiven Erkennung von G-Proteinen durch GPCRs und ihrer nachgeschalteten Aktivierung mittels Mutagenesestudien“

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 16.09.2020

.....

(Volker Jelinek)

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	II
Publikationen / Grants	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	VIII
Zusammenfassung	X
Summary	XII

Kapitel 1: Einleitung

1.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)	2
1.1.1 Einteilung / Klassifizierung von GPCRs.....	4
1.1.2 Grundaufbau und Strukturaufklärung von GPCRs	5
1.1.3 Aktivierung von GPCRs.....	7
1.1.4 Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren	8
1.1.5 Histamin-Rezeptoren	9
1.2 Signalweiterleitung von GPCRs	10
1.2.1 Heterotrimere G-Proteine.....	11
1.2.2 Struktur der G α -UE und Kreislauf der G-Protein-Aktivierung.....	12
1.2.3 G-Protein-Signalwege.....	14
1.2.4 Kopplungsspezifität zwischen GPCR und G-Protein.....	16
1.2.5 Signalabschaltung durch GRK und Arrestin	19
1.3 Ziel dieser Arbeit.....	20

Kapitel 2: Materialien.....

2.1 Geräte	22
2.2 Software	24
2.3 Verbrauchsmaterialien.....	24
2.4 Chemikalien.....	25
2.5 Plasmide	27
2.6 PCR-Primer	30
2.7 Prokaryotische und Eukaryotische Zelllinien	36
2.8 Hergestellte Puffer / Lösungen	36

Kapitel 3: Methoden	40
3.1 Zellkultur	40
3.1.1 Kultivierung von HEK293T-Zellen	40
3.1.2 Transfektion von HEK293T-Zellen	41
3.1.3 Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin	41
3.1.4 Pertussis-Toxin Vorbehandlung	41
3.2 Molekularbiologische Methoden	42
3.2.1 PCR.....	42
3.2.2 Restriktionsverdau	44
3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese	44
3.2.4 Gel-Extraktion	45
3.2.5 Ligation	46
3.2.6 Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien	47
3.2.7 Generierung chemisch kompetenter <i>E. coli</i>	47
3.2.8 Transformation in <i>E. coli</i> Bakterien	48
3.2.9 DNA-Präparationen	50
3.2.10 Einstellung der DNA-Konzentration	52
3.2.11 DNA-Sequenzierung	52
3.3 Klonierstrategien	53
3.3.1 Punktmutationen	53
3.3.2 Subklonierung	54
3.3.3 Gibson-Assembly	55
3.4 FRET-Experimente	58
3.4.1 FRET – Förster-Resonanz-Energie-Transfer	58
3.4.2 Fluorophore	60
3.4.3 Fluoreszenzmikroskopie-Setup	62
3.4.4 Allgemeine experimentelle Durchführung	63
3.5 G-Protein-Bindungsassay in permeabilisierten Zellen	64
3.5.1 Transfektion des G-Protein-Bindungsassays	64
3.5.2 Permeabilisierung von Zellen	64
3.5.3 Messung des G-Protein-Bindungsassays	65
3.5.4 Quantifizierung der Bindungsstabilität von G-Proteinen durch Dissoziationskinetiken	66

3.6 Indirekter G-Protein-Aktivierungsassay (GRK2-Rekrutierung durch G$\beta\gamma$)	67
3.6.1 Transfektion: GRK2-Rekrutierung durch G $\beta\gamma$	67
3.6.2 Indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung	67
3.6.3 Konzentrations-Wirkungskurven der G α -Aktivierung	68
3.6.4 Aktivierung von endogenen G-Proteinen	69
3.7 Direkter G-Protein-Aktivierungsassay	69
3.7.1 Transfektion: Direkter G-Protein-Aktivierungsassay	69
3.7.2 Direkte Messung der G-Protein-Aktivierung	70
3.8 Statistik.....	71
 Kapitel 4: Ergebnisse	 72
4.1 Einfluss von G-Protein Strukturen auf die Kopplungsspezifität	72
4.1.1 Untersuchung des G α C-Terminus ($\alpha 5$ -Helix)	73
4.1.2 Untersuchung von chimären G α -Proteinen mit dem M $_3$ R	78
4.1.3 Untersuchung von chimären Gq-Proteinen mit dem M $_3$ R	86
4.1.4 Vergleich von chimären G α - / Gq-Proteinen mit dem H $_1$ R	92
4.1.5 Vergleich von M $_3$ - und H $_1$ -Rezeptoren in <i>Heatmaps</i>	102
4.2 Einfluss von Rezeptorstrukturen auf die Kopplungsspezifität	104
4.2.1 Untersuchung von Punktmutationen im M $_3$ R	104
4.2.2 Untersuchung von M $_3$ R-Mutanten mit deletiertem ICL3 (M $_3\Delta$ ICL3)	107
4.2.3 Untersuchung chimärer M $_3$ R mit ausgetauschtem ICL3 (M $_3$ ICL3M $_2$)	108
4.2.4 Untersuchung chimärer M $_3$ R und M $_2$ R mit ausgetauschter Helix 8 (M $_3$ H8M $_2$ / M $_2$ H8M $_3$)	110
 Kapitel 5: Diskussion	 112
5.1 FRET-Experimente	112
5.2 Strukturelle Einflüsse auf die Kopplungsspezifität.....	114
5.2.1 Einfluss von GPCR-Strukturen auf die Kopplungsspezifität	114
5.2.2 Einfluss von G-Protein-Strukturen auf die Kopplungsspezifität.....	116
5.3 Schlussfolgerung	118

<i>Literaturverzeichnis</i>	<i>120</i>
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	<i>128</i>
<i>Tabellenverzeichnis.....</i>	<i>131</i>
<i>Danksagungen</i>	<i>132</i>
<i>Lebenslauf</i>	<i>134</i>

Publikationen / Grants

Veröffentlichte Manuskripte

Jelinek, V. and Bünemann, M., “Structures in G proteins important for subtype-selective receptor binding and subsequent activation.” Communications Biology, 2020 (in Revision)

Posterpräsentationen

8th Focused Meeting on Cell Signalling, 04/2020 (Leicester) (abgesagt durch COVID-19)

Jelinek, V. und Bünemann, M.;

“Structural analysis of determinants for high-affinity binding of G proteins to muscarinic and histaminic receptors”.

4th German Pharm-Tox Summit, 85. Jahrestagung der DGPT, 02/2019 (Stuttgart)

Jelinek, V. und Bünemann, M.;

“Structural analysis of determinants for high-affinity binding of G proteins to muscarinic receptors”.

7th Focused Meeting on Cell Signalling, 04/2018 (Nottingham)

Jelinek, V. und Bünemann, M.;

“Role of Galpha C-terminal helix for binding affinity to muscarinic receptors”.

3rd German Pharm-Tox Summit, 84. Jahrestagung der DGPT, 02/2018 (Göttingen)

Jelinek, V. und Bünemann, M.;

“Role of Galpha C-terminal helix for binding affinity to muscarinic receptors”.

ReceptorLight Symposium No. 1, 06/2017 (Würzburg)

Jelinek, V., Ilyaskina O.S. und Bünemann, M.;

“Role of Galpha C-terminal helix for binding affinity to muscarinic receptors”.

Veröffentlichte Abstracts

Experimental Biology 2020 Meeting Abstracts:

Jelinek, V. and Bünemann, M.; “Structural analysis of determinants for high-affinity binding of G proteins to muscarinic and histaminic receptors.”; FASEB Volume 34 (April 2020), Issue S1, <https://doi.org/10.1096/fasebj.2020.34.s1.03276>

Abstracts of the 85th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 21th Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology Germany (VKliPha).

Jelinek, V. und Bünemann, M.; “Structural analysis of determinants for high-affinity binding of G proteins to muscarinic receptors”; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **392**, 1–88, P8 (2019). <https://doi.org/10.1007/s00210-019-01621-6>

Abstracts of the 84th Annual Meeting of the German Society for Experimental and Clinical Pharmacology and Toxicology (DGPT) and the 20th Annual Meeting of the Association of the Clinical Pharmacology Germany (VKliPha).

Jelinek, V. und Bünemann, M.; “Role of Galpha C-terminal helix for binding affinity to muscarinic receptors”; *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* **391**, 1–93, P186 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1477-5>

Grants

Marburg International Doctorate (DAAD) Reisestipendium für das 7th Focused Meeting on Cell Signalling, Nottingham (2018)

Abkürzungsverzeichnis

a.u.	arbitrary unit (einheitenlos)
AC	Adenylylcyclase
ACh	Acetylcholin
ANOVA	Analysis of Variance (Varianzanalyse)
AS	Aminosäure
AUC	Area Under the Curve (Fläche unter der Kurve)
β_2 AR	β_2 -Adrenorezeptor
bp	Basenpaare
BRET	Biolumineszens-Resonanz-Energie-Transfer
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CCh	Carbachol
CFP	Cyan-fluoreszierendes-Protein
CHRM3	Codierendes Gen für den muskarinergen M_3 -Rezeptor
Cryo-EM	Cryo-Elektronenmikroskopie
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Zellkulturmedium)
dNTPs	Desoxyribonukleotide
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EC50	Halbmaximal effektive Konzentration
ECL	Extrazellulärer Loop
F	Fluoreszenzemission
FCS	Fetales Kälberserum (Fetal Calf Serum)
FRET	Förster-Resonanz-Energietransfer
fw	<i>Forward</i> (-DNA-Primer)
G-Protein	GTP-bindendes Protein
GDP	Guanosindiphosphat
GIRK	G protein-activated inwardly rectifying K^+ -channel
Goq	Chimäres Go-Protein mit einem Teil von Gq
GPCR	G-Protein-gekoppelter Rezeptor

Gqo	Chimäres Gq-Protein mit einem Teil von Go
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
GTP	Guanosintriphosphat
H ₁ R	H ₁ -Rezeptor
HCN-Kanal	Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel
HEK-Zellen	Humane embryonale Nierenzellen
HRH1	Codierendes Gen für den Histamin H ₁ -Rezeptor
ICL	Intrazellulärer Loop
IP ₃	Inositoltrisphosphat
kb	Kilobasen
M ₃ H8M ₂	Chimärer M ₃ -Rezeptor mit der Helix 8 des M ₂ -Rezeptors
M ₃ ICL3M ₂	Chimärer M ₃ -Rezeptor mit dem ICL3 des M ₂ -Rezeptors
M ₃ R	M ₃ -Rezeptor
M ₃ ΔICL3	M ₃ -Rezeptor, bei dem der ICL3 herausgeschnitten wurde
mCit	mCitrine (Variante des YFPs)
mTurq2	mTurquoise 2 (Variante des CFPs)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (phosphate-buffered saline)
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PKA	Proteinkinase A
PLC	Phospholipase C
PLL	Poly-L-lysin
PTX	Pertussis-Toxin
RNA	Ribonukleinsäure
ROI	Region of Interest
rv	Reverse (-DNA-Primer)
SEM	Standard Error of the Mean
TM	Transmembranäre Helix
UE	Untereinheit
YFP	Gelb (yellow)-fluoreszierendes-Protein

Zusammenfassung

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden mit ca. 800 verschiedenen Individuen die größte Rezeptorgruppe des menschlichen Genoms und sind die Zielstruktur von ca. 30% aller zugelassenen Medikamente. Sie binden vielfältige extrazelluläre Liganden, wie z.B. Neurotransmitter oder Hormone, um Signale ins Zellinnere weiterzuleiten, ohne dass die Liganden selbst die Zellmembran überwinden müssen. Je nachdem an welche der vier verschiedenen Klassen heterotrimerer G-Proteine GPCRs intrazellulär koppeln, werden spezifische physiologische Vorgänge in einer Zelle ausgelöst. Daher ist das Verständnis des Mechanismus der selektiven G-Protein-Erkennung und Kopplung durch GPCRs von zentraler Bedeutung.

Kürzlich veröffentlichte Strukturen von GPCR-G-Protein-Komplexen haben das Wissen, wie GPCRs mit G-Proteinen interagieren, zwar deutlich erweitert, jedoch sind sie nur Momentaufnahmen, die nicht die zeitliche Abfolge des mehrstufigen Kopplungsprozesses abbilden können. Außerdem konnten sie keine spezifischen Interaktionsstellen zwischen GPCRs und bestimmten $G\alpha$ -Unterfamilien enthüllen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden daher FRET-Experimente in lebenden Zellen durchgeführt, um die Subtyp-spezifischen Eigenschaften vielfältiger Gq - und Go -basierter $G\alpha$ -Chimären zu untersuchen, die für die selektive Bindung und Aktivierung durch M_3 - (M_3R) und H_1 -Rezeptoren (H_1R) verantwortlich sind. Dazu wurden die relativen Bindungsstabilitäten von $G\alpha$ -Chimären an Rezeptoren in permeabilisierten Zellen bestimmt, indem die Dissoziationskinetiken der $G\alpha$ -Chimären vom M_3R und H_1R unter Nukleotid-freien Bedingungen miteinander verglichen wurden. Außerdem wurden die Aktivierungspotenzen der $G\alpha$ -Chimären in lebenden Zellen durch Auswerten von Konzentrations-Wirkungskurven analysiert, die letztlich die für die Signalweiterleitung relevante Kopplungseffizienz widerspiegeln. Für beide Rezeptoren konnten wir zeigen, dass sowohl die Bindungs- als auch die Aktivierungscharakteristiken von dafür essenziellen $G\alpha$ -Strukturen, wie dem $\alpha N/\beta 1$ -Loop, dem $\beta 2/\beta 3$ -Loop und der $\alpha 5$ -Helix, von einer G-Protein-Klasse auf eine andere übertragen werden konnten. Diese Strukturen unterschieden sich außerdem in ihren Auswirkungen auf die selektive Bindung und die nachfolgende Aktivierung, je nachdem welcher Rezeptor beteiligt war.

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden zusätzlich strukturelle Elemente im Rezeptor hinsichtlich ihres Einflusses auf die Kopplungsselektivität untersucht. Erste Versuche, die Kopplungseigenschaften vom M_3R gegenüber Gq- oder Go-Proteinen durch Punktmutationen grundlegend zu verändern, waren jedoch nicht erfolgreich. Deshalb wurde der ganze dritte intrazelluläre Loop (ICL3) des M_3R s herausgeschnitten, jedoch hatte dies ebenfalls keine Auswirkungen auf die Bindungsstabilität von Gq- und Go-Proteinen. Wurde im Gegensatz dazu aber der ICL3 des M_3R s mit dem des verwandten, aber ausschließlich Gi/o-koppelnden M_2R s ersetzt (M_3ICL3M_2), erhöhte sich die Stabilität der Bindung von Gao. Zuletzt wurde die Bedeutung der Helix 8 für die Selektivität der G-Protein-Kopplung untersucht, indem weitere Chimären zwischen M_3R und M_2R kloniert wurden. Das führte bei der M_3R -basierten M_3H8M_2 -Chimäre zu einem kompletten Kopplungsverlust gegenüber Gao, obwohl der M_2R mit derselben Helix 8 problemlos an Gi/o-Proteine binden kann. Im Einklang mit diesem Ergebnis war die Bindungsstabilität von Gao an der umgekehrten M_2H8M_3 -Chimäre deutlich erhöht und sogar die Kopplung von Gq wurde trotz des M_2R -Grundgerüsts ermöglicht.

Insgesamt bietet diese Arbeit neuartige Einblicke in die molekularen Grundlagen der Kopplungsselektivität zwischen verschiedenen Rezeptoren und G-Proteinen.

Summary

G protein-coupled receptors (GPCRs) represent the largest human receptor family with approximately 800 individuals and serve as a binding target for about 30% of all marketed drugs. They bind to various extracellular ligands such as neurotransmitters or hormones, to transduce signals into the cell without the need for passing the cell membrane. Depending on which of the four heterotrimeric G protein families these receptors preferentially couple to, specific physiological responses will be induced in a cell. Therefore, understanding the mechanism of selective G protein recognition and activation by receptors is of central importance.

Recently published structures of GPCR-G protein complexes have significantly enhanced the understanding of how GPCRs interact with G proteins. However, they are only snapshots which miss the complete temporal sequence of the multi-step coupling process. Moreover, they failed to reveal specific interaction sites between GPCRs and distinct $G\alpha$ -subfamilies.

Therefore, in the first part of this thesis, the influence of subtype-specific $G\alpha$ -structures on the stability of GPCR-G protein complexes and the subsequent activation by two Gq-coupled receptors was directly compared. For that reason, FRET-assays were performed in living cells to distinguish multiple Go and Gq-based $G\alpha$ -chimeras in their ability to be selectively bound and activated by muscarinic M_3 (M_3R) and histaminic H_1 receptors (H_1R). Firstly, binding stabilities of $G\alpha$ -chimeras were determined in permeabilized cells by comparing their dissociation kinetics from the Gq-coupled M_3R and H_1R under nucleotide-depleted conditions. Moreover, the activation potencies of $G\alpha$ -chimeras were examined in intact cells by evaluating concentration-response curves that ultimately reflect physiologically relevant coupling efficiencies. For both receptors, we obtained results showing that binding and activation characteristics of crucial $G\alpha$ -structures like the N-terminus including the $\alpha N/\beta 1$ -hinge, the $\beta 2/\beta 3$ -loop and the $\alpha 5$ -helix can be transferred from one G protein class onto another. Furthermore, key selectivity determinants differ in their impact on selective binding to GPCRs and subsequent activation depending on the specific receptor.

In the second part of this thesis, structural elements in the receptor were investigated with regard to their influence on coupling-selectivity. Initial attempts to alter the M_3R coupling-properties towards Gq or Go proteins by point mutations were without success. Therefore, the big third intracellular loop (ICL3) of the M_3R was deleted which again did not influence the binding stabilities of Gq and Go proteins. However, swapping the ICL3 with the closely related Gi/o-coupled M_2R

(M₃ICL3M₂) revealed an enhanced binding to Gαo. Finally, the role of helix 8 for the generation of G protein coupling-preferences was investigated by creating chimeras between the M₃R and M₂R. Surprisingly, the M₃R-based M₃H8M₂-chimera could not bind to Gαo anymore even though the M₂R, containing the same helix 8, couples to Gi/o proteins readily. In line with this result, the stability of Gαo at the M₂H8M₃-chimera was distinctly enhanced and even Gq-binding was enabled.

Altogether, these findings provide new insights into the molecular basis of coupling-selectivity between various GPCRs and G proteins.

Kapitel 1: Einleitung

1.1 | G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs)

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) bilden mit ca. 800 verschiedenen Individuen die größte Rezeptorfamilie des menschlichen Genom (Bjarnadóttir et al., 2006). Sie sind dafür verantwortlich, dass der Körper auf Umweltreize, aber auch körpereigene Signale reagieren kann. Um Sehen, Riechen, Schmecken und die Kommunikation der Zellen untereinander zu ermöglichen, werden chemische Botenstoffe wie Hormone (z.B. Adrenalin, Glukagon), Neurotransmitter (z.B. Acetylcholin, Histamin, Serotonin) oder Metabolite (z.B. Acetat, Lactat, Aminosäuren) abgegeben, die zielgerichtet an spezifische Rezeptoren binden (Stauch & Cherezov, 2018) (siehe Abb. 1). Diese GPCRs befinden sich in der Zellmembran, damit die oft zellimpermeablen chemischen Verbindungen (Liganden) extrazellulär an den Rezeptor binden können. Wird dieser dabei aktiviert, wird die Konformationsänderung in der Ligandenbindetasche bis in seinen intrazellulären Teil übertragen. Im Inneren der Zelle kann ein GPCR dort vor allem G-Proteine, aber auch andere Effektoren rekrutieren, binden und ggf. aktivieren, weshalb diese Rezeptoren auch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren genannt werden. Physiologisch dient der gesamte Prozess der Signaltransduktion in die Zellen hinein, um dort spezifische zelluläre Effekte auszulösen.

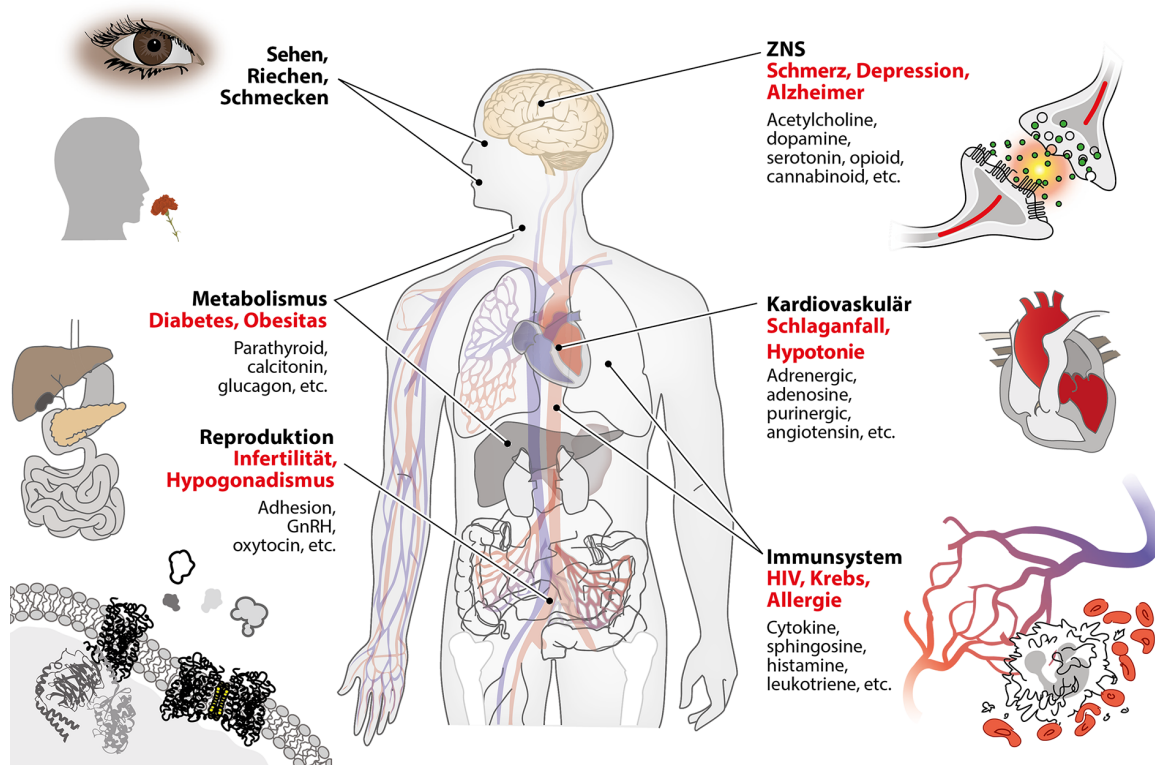


Abb. 1 | GPCRs in Physiologie und Pathologie (modifiziert nach Stauch & Cherezov, 2018)

GPCRs eignen sich sehr gut als Zielstruktur für Arzneimittel, da diese anstelle von körpereigenen Liganden an den Rezeptoren binden und dadurch intrazelluläre Vorgänge verstärken oder abschwächen können, ohne selbst die Zellmembran überwinden zu müssen. Die weitreichende Bedeutung von GPCRs für das Gesundheitssystem zeigt sich, wenn man berücksichtigt, dass aktuell etwa ein Drittel aller auf dem Markt zugelassenen Arzneimittel GPCRs adressieren (Abb. 2).

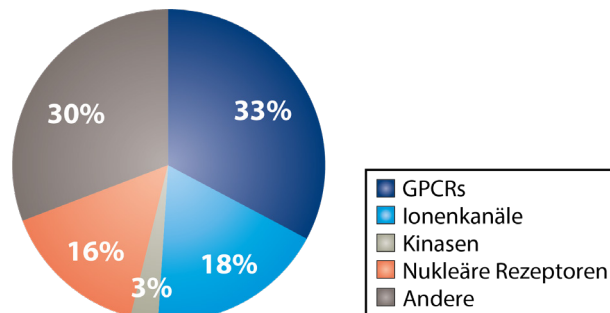


Abb. 2 | Proteinfamilien als Arzneimittelzielstruktur (modifiziert nach Santos et al. 2016)

Für viele Rezeptorfamilien steht jedoch noch kein entsprechender Arzneistoff zur Verfügung. In Abb. 3 ist dargestellt, dass im Jahr 2017 erst etwa ein Viertel der nicht-olfaktorischen (nicht für den Geruchssinn zuständigen) GPCRs das Ziel von zugelassenen Medikamenten ist (rot), während weitere 17% zu dieser Zeit in klinischen Studien getestet wurden (grün) (Hauser et al., 2017). Dies zeigt, dass noch viel Potential zur Erforschung weiterer Arzneimittel besteht, die GPCRs als Zielstruktur nutzen, wozu auch die Suche nach chemischen Verbindungen zählt, die an sogenannte „Orphan-Receptors“ binden, also Rezeptoren, deren körpereigene Liganden bisher noch unbekannt sind.

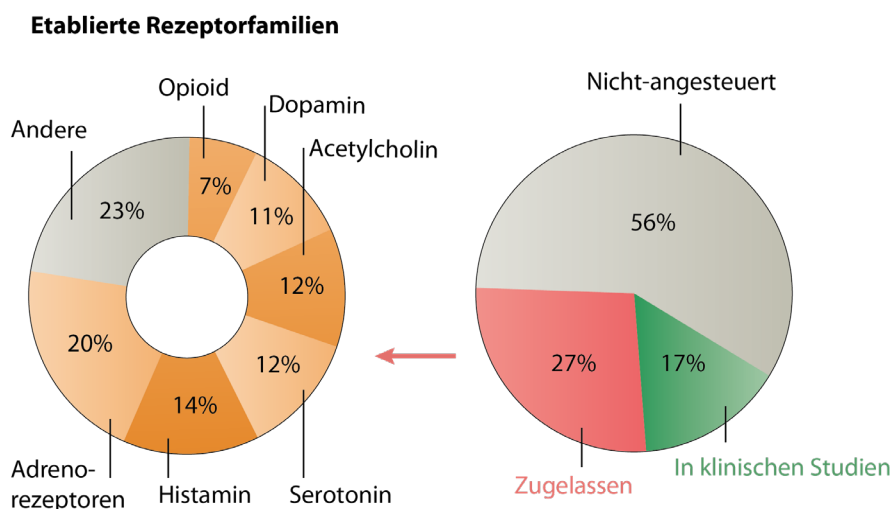


Abb. 3 | GPCRs als Arzneimittelzielstruktur (modifiziert nach Hauser et al. 2017)

1.1.1 | Einteilung / Klassifizierung von GPCRs

GPCRs lassen sich nach phylogenetischen Merkmalen in fünf verschiedene Gruppen einteilen. Die größte Gruppe bilden die Rhodopsin-ähnlichen GPCRs (Klasse A) mit ca. 700 Vertretern, wovon alleine 388 für den Geruchssinn (olfaktorische Rezeptoren) zuständig sind (Stevens et al., 2013). Diese Gruppe kann von Licht oder verschiedensten Molekülen aktiviert werden, wozu unter anderem Amine, Peptide, Lipide, Nukleotide, und Steroide zählen. Darüber hinaus gibt es noch die Sekretin- (Klasse B1, 15 GPCRs), die Adhäsions- (Klasse B2, 24 GPCRs), die Glutamat- (Klasse C, 15 GPCRs) und die Frizzled- (inkl. Smoothed-) / Taste2-Rezeptoren (Klasse F, 24 GPCRs). Diese lassen sich alle in einen phylogenetischen Baum anhand ihrer Abstammung einsortieren (Abb. 4). Die nah miteinander verwandten M₃- und H₁-Rezeptoren, die in dieser Arbeit näher untersucht wurden, sind jeweils in blau und rot gekennzeichnet.

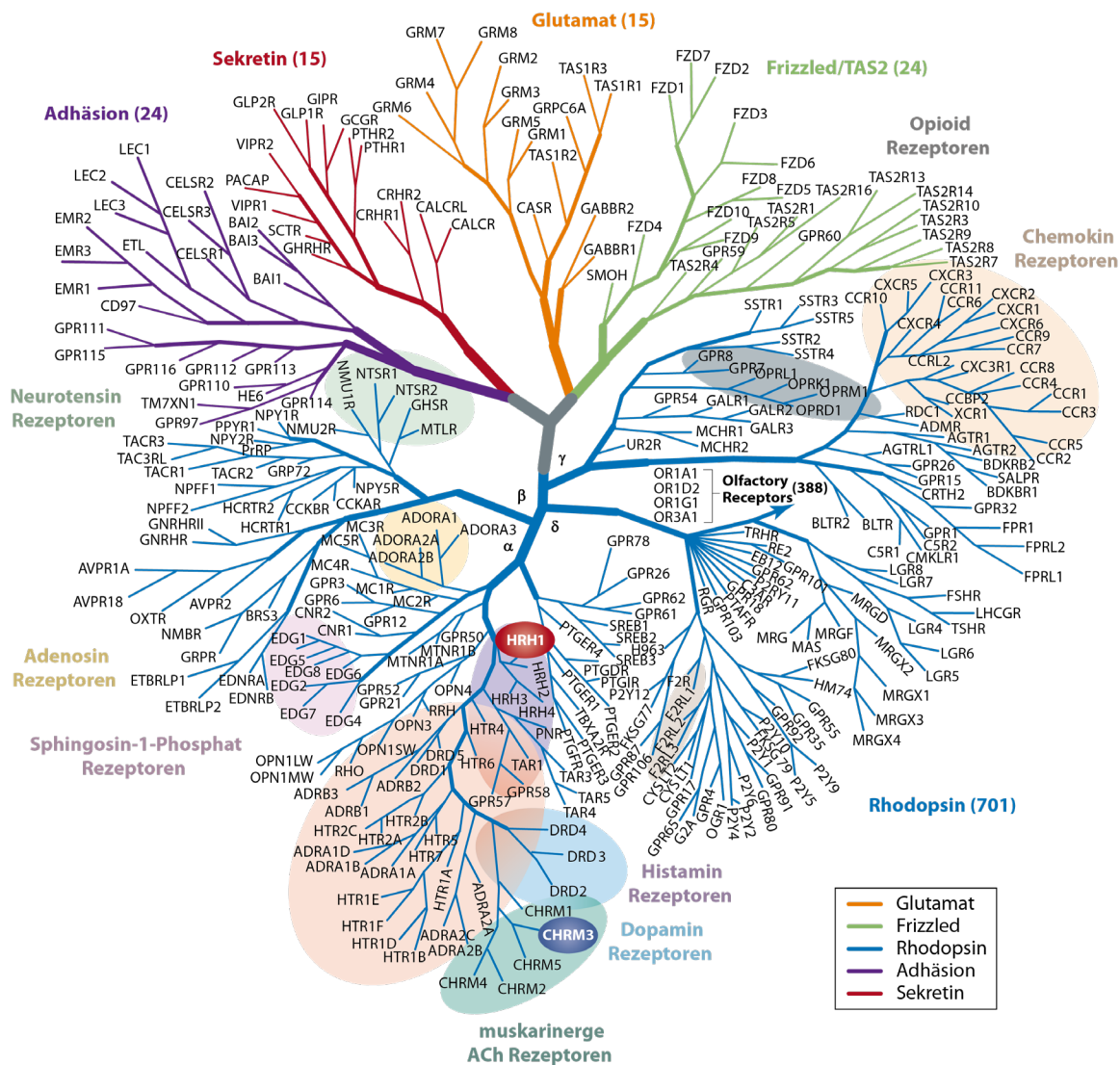


Abb. 4 | Phylogenetischer Baum und Klassifizierung von GPCRs (modifiziert nach Stevens et al. 2013)
Der H₁-Rezeptor (HRH1) und der M₃-Rezeptor (CHRM3) sind farblich hervorgehoben.

1.1.2 | Grundaufbau und Strukturaufklärung von GPCRs

Alle G-Protein-gekoppelten Rezeptoren besitzen als charakteristisches Merkmal sieben transmembranäre α -Helices, die den Rezeptor in der Membran verankern und durch jeweils drei extrazelluläre (ECLs) und drei intrazelluläre Loops (ICLs) miteinander verbunden sind. Der Amino-N-Terminus befindet sich außerhalb der Zelle, während der Carboxy-C-Terminus intrazellulär nach der Helix 8 des Rezeptors lokalisiert ist. Schematisch lassen sich GPCRs als „Snake-Plot“ darstellen (Abb. 5a), jedoch erkennt man die dreidimensionale Einbettung des Rezeptors in die Zellmembran besser, wenn man z.B. von der extrazellulären Seite aus auf ihn schaut (Abb. 5b).

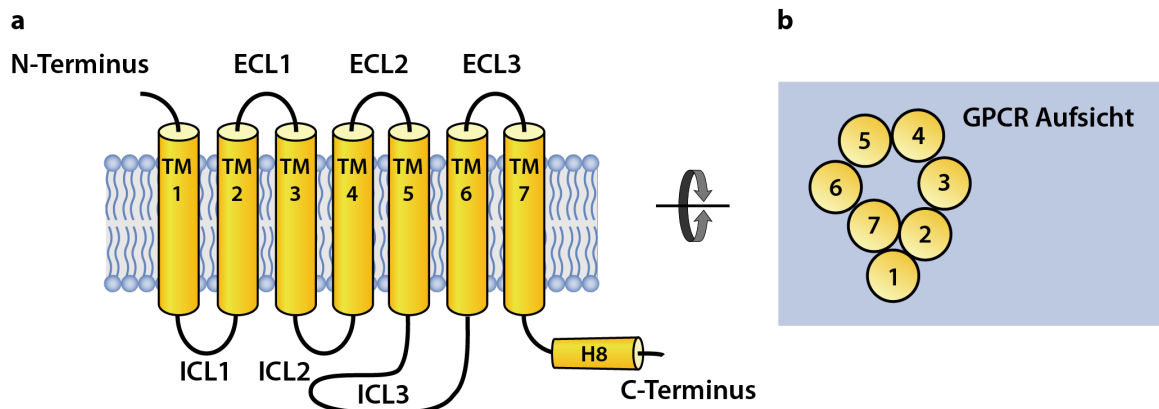


Abb. 5 | Schematische Darstellungen eines GPCRs

GPCR-Strukturen lassen sich nur unter großem Aufwand bestimmen, da sie sehr flexibel und in Detergenzien bzw. während der Aufreinigung sehr instabil sind (Tate & Schertler, 2009). Die Entwicklungen der letzten 20 Jahre ermöglichten zunächst nur die für eine Röntgenstrukturanalyse nötige Kristallisation von GPCRs in der stabileren inaktiven Konformation (graue Balken, Abb. 6), da Agonist-gebundene Rezeptor-Strukturen nur einen intermediären und daher instabilen Zustand abbilden und deshalb erst wesentlich später bestimmt werden konnten (pinke Balken, Abb. 6). Für die Strukturbestimmung in der vollständig aktiven Konformation ist zusätzlich die Stabilisierung durch einen intrazellulären Bindungspartner nötig, wie z.B. durch einen G-Protein-nachahmenden *Nanobody* (Rasmussen et al. 2011a). Erst 2011 konnte die bislang einzige Röntgenkristallstruktur eines GPCRs in Komplex mit einem heterotrimeren G-Protein (β_2 AR-Gs Komplex) aufgeklärt werden (Abb. 7) (Rasmussen et al. 2011b). Fortschritte in der Cryo-Elektronenmikroskopie haben jedoch seit 2017 die weitere Bestimmung von Komplexen zwischen Rezeptor und G-Protein (siehe 1.2.4), aber auch anderen Effektoren, ermöglicht (gepunktete Balken, Abb. 6) und werden zukünftig für die Detektion noch kleinerer Proteine in höherer Auflösung sorgen (Congreve et al., 2020).

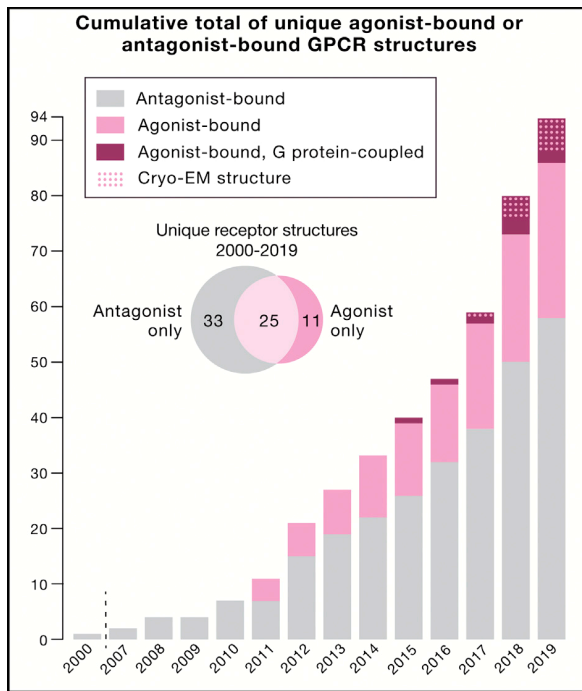


Abb. 6 | Anzahl an veröffentlichten GPCR Strukturen (Congreve et al., 2020)

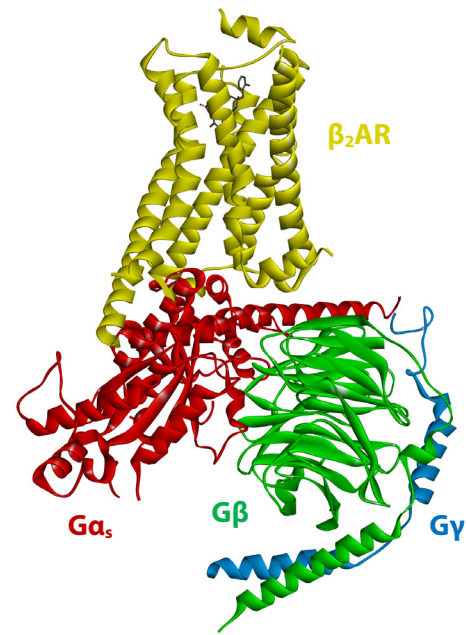


Abb. 7 | Struktur des β_2AR -Gs Komplexes (Sören G.F. Rasmussen et al., 2011)

Vergleicht man die dreidimensionalen Strukturen der verschiedenen GPCR-Klassen miteinander, fällt auf, dass Klasse A Rezeptoren typischerweise einen kurzen N-Terminus besitzen, wohingegen die Sekretin-Rezeptoren (Klasse B) mit ihrer großen extrazellulären Domäne peptidische Liganden binden können, die nur zu einem kleinen Teil mit den Transmembranregionen interagieren (Congreve et al., 2020). Klasse C Rezeptoren haben dagegen eine noch viel größere N-terminale Domäne und bilden stabile Dimere, die essentiell für ihre Signalweiterleitung sind (Abb. 8).

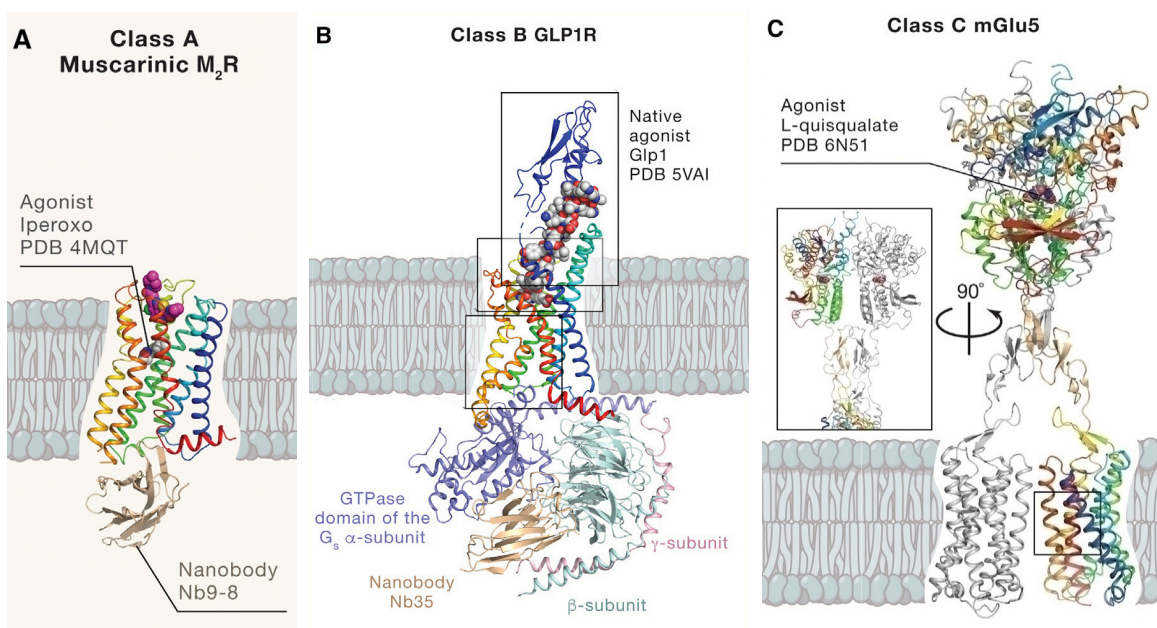


Abb. 8 | Diversität von GPCR Strukturen verschiedener Klassen (modifiziert nach Congreve et al. 2020)

1.1.3 | Aktivierung von GPCRs

Sind die aktive und inaktive Struktur desselben Rezeptors aufgeklärt, lässt sich durch deren Vergleich ableiten, wie er seine Konformation nach Rezeptoraktivierung verändert. Dadurch konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung eines passenden Agonisten in die extrazelluläre Binde-tasche des GPCRs eine Konformationsänderung bis in die intrazellulären Domänen ausgelöst wird. Daran sind zahlreiche konservierte Strukturen beteiligt, wie z.B. das DRY, PIF und das NPxxY Motiv (Zhou et al., 2019). Der größten Konformationsänderung unterliegt jedoch die TM6, die eine rotierenden Auswärtsbewegung ausführt (Abb. 9a), um die intrazelluläre Bindetasche des Rezeptors für Effektormoleküle im Inneren der Zelle, also insbesondere für G-Proteine, zu öffnen (Kobilka, 2011). Dagegen verändert sich die Position der anderen Helices auf der intrazellulären Seite nur geringfügig (Abb. 9b). Weiterhin wurde gezeigt, dass sich gleichzeitig die orthosterische Binde-tasche verengt, was zur Affinitätssteigerung des Liganden führt (Warne et al., 2019).

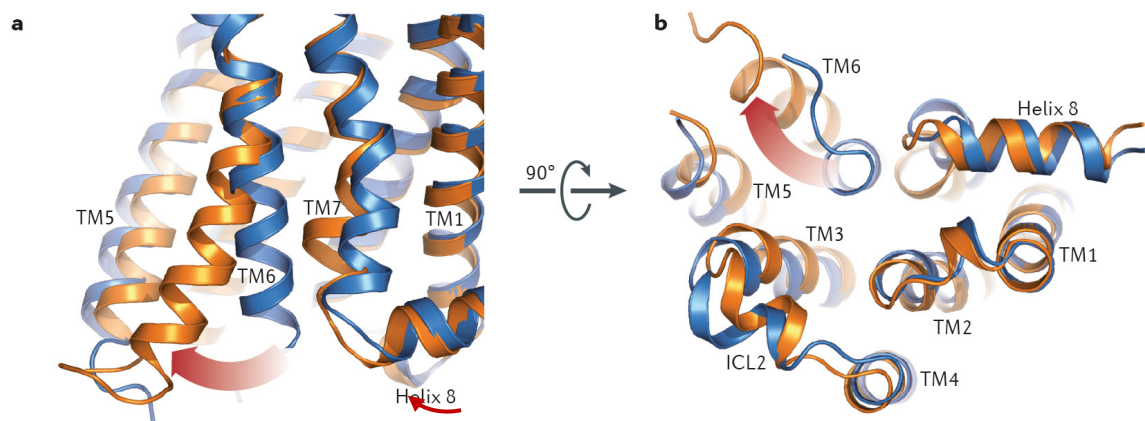


Abb. 9 | Aktivierung des M₂ Rezeptors (Kruse et al., 2014)

a Aktive und inaktive Struktur des M₂Rs sind überlagert. **b** Ansicht von der intrazellulären Seite aus.

Die Konformationsänderungen während der Rezeptoraktivierung können mit Hilfe eines GPCR-Sensors auch funktionell gemessen werden, indem FRET-Signale ausgewertet werden, die auf Abstandsänderungen zweier Fluorophore zwischen ICL3 (angrenzend an TM6) und C-Terminus reagieren (Vilardaga et al., 2003). Sogenannte volle Agonisten lösen in sättigender Konzentration am Rezeptor eine maximale Antwort aus, während Partialagonisten, die evtl. sogar affiner sein können (nach links verschobene Kurve), den Maximaleffekt nicht erreichen können (Abb. 10). Antagonisten binden zwar genauso in die extrazelluläre Rezeptorbindetasche wie Agonisten, verhalten sich jedoch neutral und werden pharmakologisch dazu genutzt, körpereigene Liganden kompetitiv zu verdrängen und den Rezeptor dadurch indirekt zu hemmen. Dagegen sind inverse

Agonisten sogar in der Lage, die inaktive Rezeptorkonformation zu stabilisieren und können damit auch die basale Aktivität des Rezeptors reduzieren, die alleine durch die Rezeptordynamik, auch ohne die Bindung eines Liganden, entsteht.

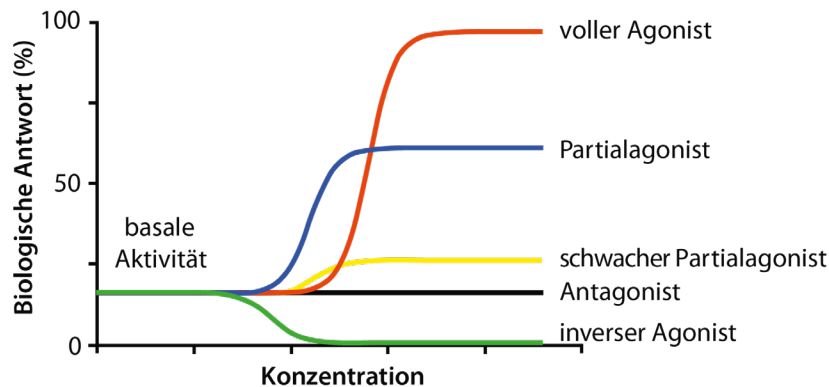


Abb. 10 | Liganden-abhängige Rezeptoraktivierung (modifiziert nach Tate 2012)

1.1.4 | Muskarinerge Acetylcholin-Rezeptoren

Die Familie der muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren gehört zu den Rhodopsin-Rezeptoren und umfasst fünf verschiedene Typen, wovon M_1R , M_3R und M_5R den G_q -gekoppelten Rezeptoren zugeordnet werden (G-Proteine, siehe 1.2.1), während M_2R und M_4R G_i/o -gekoppelt sind (Abb. 11). Die dreidimensionalen Strukturen der beiden Gruppen sind sich jedoch trotz der verschiedenen Kopplungseigenschaften sehr ähnlich, wie stellvertretend für den M_3R und den M_2R gezeigt ist (Abb. 12).

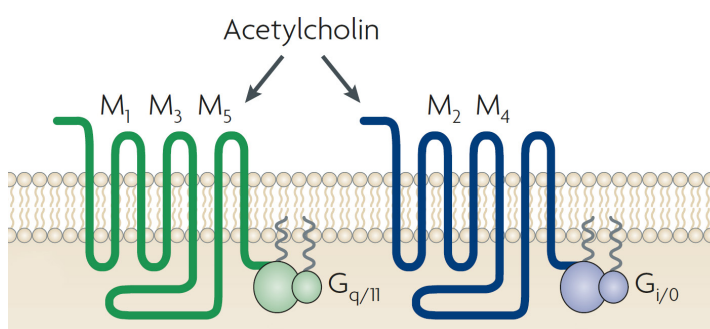


Abb. 11 | Kopplungspräferenzen von muskarinergen Rezeptoren (modifiziert nach Wess et al., 2007)

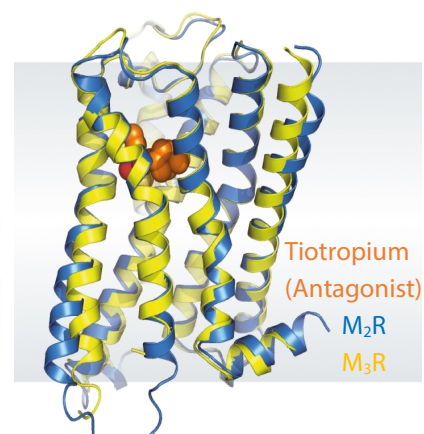


Abb. 12 | Inaktive Strukturen des M_2 - und M_3 -Rezeptors (Kruse et al., 2014)

Muskarinerge Rezeptoren spielen im Körper eine wichtige Rolle, da die hauptsächlich im zentralen Nervensystem (ZNS) exprimierten M_1 -, M_4 - und M_5 -Rezeptoren dort zentrale Funktionen regulieren. Durch Fehlfunktionen können sie u.a. an Krankheiten wie Alzheimer, Parkinson, Depressionen und Schizophrenie beteiligt sein. M_2 - und M_3 -Rezeptoren sind zusätzlich auch in der Peripherie, außerhalb des ZNS, zu finden und wirken dort auf parasymphatisch innerviertes Gewebe. Sie üben Funktionen wie die Senkung der Herzfrequenz (über M_2R), die Kontraktion glatter Muskulatur (über M_3R) oder die Drüsensekretion (über M_3R) aus (Wess et al., 2007).

In der Pharmakologie werden Arzneistoffe, die an muskarinerge Rezeptoren binden, unter anderem zur Behandlung des Glaukoms, der chronisch obstruktiven Lungenerkrankung (COPD) oder einer überaktiven Blase eingesetzt (Kruse et al., 2014). Da muskarinerge Rezeptoren alle gleichermaßen von Acetylcholin aktiviert werden und ihre orthosterischen Bindetaschen (eigentliche Ligandenbindestellen) sehr ähnlich sind (Thal et al., 2016), kann man sie mit Arzneistoffen nur schwer subtyp-spezifisch ansteuern, was zu unerwünschten Arzneimittelwirkungen führen kann. Deshalb wird aktuell auch nach allosterisch (andernorts) bindenden Liganden gesucht, die voraussichtlich gezielter bestimmte Rezeptoren ansprechen können.

1.1.5 | Histamin-Rezeptoren

Die Familie der Histamin-Rezeptoren umfasst vier verschiedene Typen, die phylogenetisch nah mit den muskarinergen Rezeptoren verwandt sind (Abb. 4) und ebenso von einem endogenen Amin, in diesem Fall Histamin, aktiviert werden. Die Kopplung der verschiedenen Rezeptor-Subtypen ist sehr vielfältig, da der H_1R Gq-Proteine aktiviert, während der H_2R an Gs- und der H_3R und H_4R an Gi/o-Proteine koppelt (Tiligada & Ennis, 2020).

Bekannte Hemmstoffe von Histamin-Rezeptoren werden unter anderem zur Behandlung von Allergien, Kinetosen und leichten Schlafstörungen eingesetzt (vermittelt durch H_1R) und wurden bis zur Entdeckung der Protonenpumpeninhibitoren (z.B. Omeprazol) lange gegen eine überschießende Magensäureproduktion (vermittelt durch H_2R) eingesetzt (Panula et al., 2015). Antihistaminika haben daher einen großen Stellenwert in der Therapie und erreichten weltweit den Blockbuster-Status, d.h. einen jährlichen Umsatz von mehr als 1 Mrd. US-Dollar. Liganden für die erst deutlich später entdeckten H_3 - und H_4 -Rezeptorsubtypen sind erst vor Kurzem zugelassen worden (z.B. Pitolisant als H_3R -Antagonist zur Behandlung der Narkolepsie) bzw. befinden sich noch in klinischer Entwicklung für den H_4R (Tiligada & Ennis, 2020).

1.2 | Signalweiterleitung von GPCRs

Wird ein GPCR aktiviert, kann er mit verschiedenen Effektormolekülen interagieren, die für den β_2 AR als Übersicht in Abb. 13 dargestellt sind. Nach seiner Aktivierung koppelt er an heterotrimere G-Proteine, die ihrerseits die Signalweiterleitung über *Second-Messenger*, wie z.B. cyclisches Adenosinmonophosphat (cAMP), regulieren. Außerdem kann ein GPCR auch die G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase (GRK) rekrutieren, die diesen phosphoryliert, sodass nachfolgend Arrestin die Rezeptorinternalisierung einleiten kann, was die Zelle vor einer Dauerstimulation schützt. Aktuell wird noch kontrovers diskutiert, ob der dargestellte G-Protein-unabhängige Signalweg über Arrestin überhaupt existiert oder ob nicht auch G-Proteine dafür verantwortlich sind. In den nachfolgenden Kapiteln sind die einzelnen Prozesse jeweils genauer beschrieben.

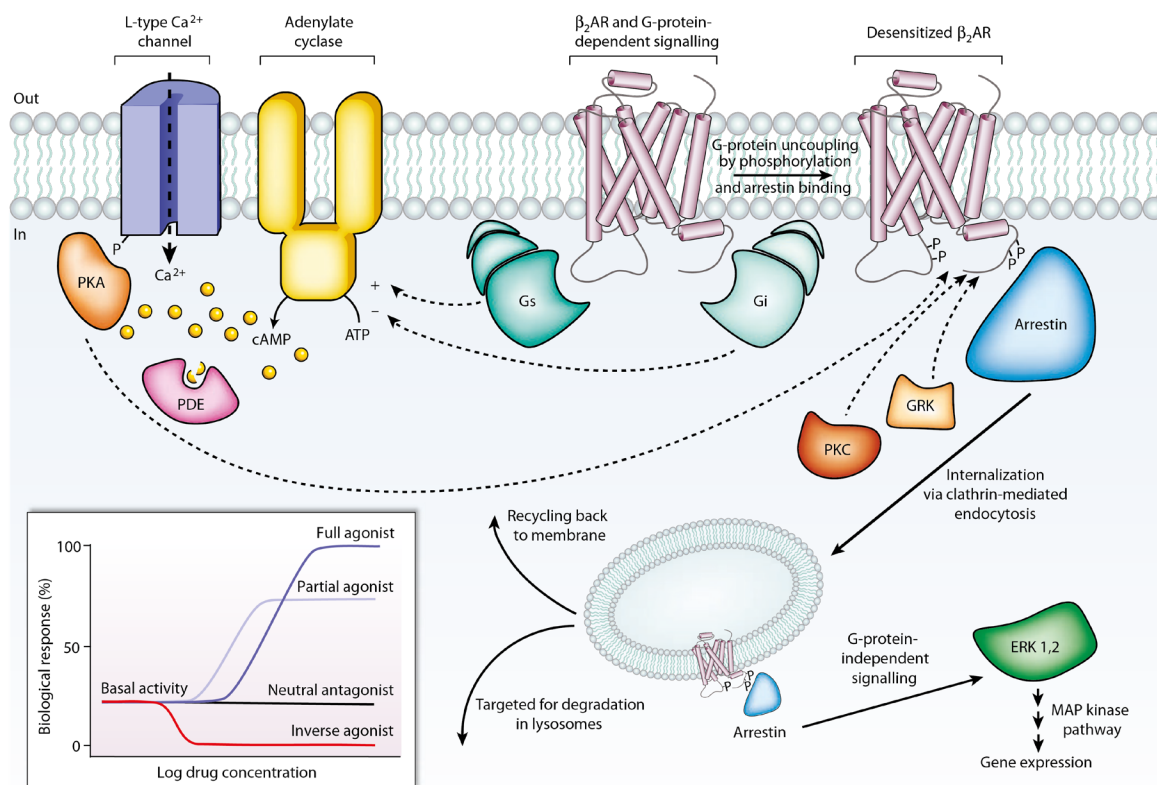


Abb. 13 | Signaltransduktion in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren
(Rosenbaum et al., 2009)

1.2.1 | Heterotrimere G-Proteine

Verantwortlich für die Signaltransduktion durch GPCRs ist die Kopplung an heterotrimere G-Proteine, die aus drei Untereinheiten (UE) bestehen ($G\alpha$, $G\beta$, $G\gamma$), wovon die β - und γ -UE fast ausschließlich als Dimer vorkommen (Hillenbrand et al., 2015). Das G-Protein ist durch einen post-translational angehängten lipophilen Rest an der $G\alpha$ - und $G\gamma$ -Untereinheit in der Membran verankert, um mit dem Rezeptor interagieren zu können. Dafür wird in der $G\alpha$ -UE das N-terminale Cystein zu einem Thioester palmitoyliert und (falls vorhanden) zusätzlich ein N-terminales Glycin zu einem Amid myristoyliert. In der $G\gamma$ -UE wird dagegen am C-Terminus ein Cystein zu einem Thioether isoprenyliert, indem ein Farnesyl- oder Geranylgeranyl-Rest angehängt wird (Wedegaertner et al., 1995).

Die zuvor genannten 800 GPCRs koppeln an nur 16 strukturell ähnliche humane $G\alpha$ -Untereinheiten, die in vier Klassen (G_s , $G_{i/o}$, $G_{q/11}$, $G_{12/13}$) unterteilt sind (Abb. 14, Abb. 15) (Simon et al., 1991). Jede G-Protein-Familie, die durch die $G\alpha$ -Untereinheit spezifiziert wird, ist für einen eigenen Signalweg verantwortlich, der unterschiedliche Reaktionen in der Zelle hervorruft.

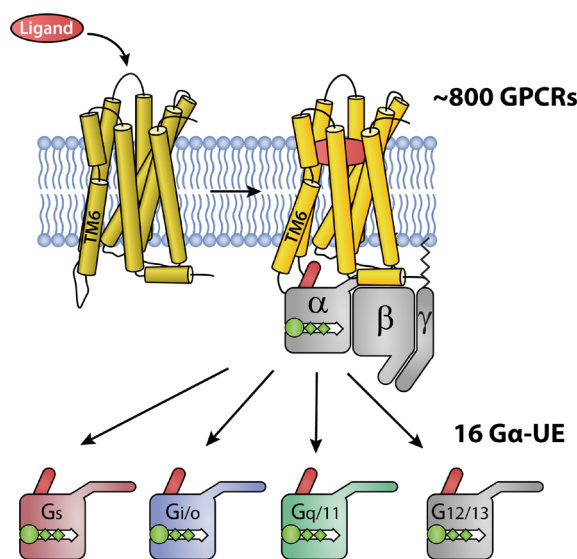


Abb. 14 | G-Protein-Kopplung von vier verschiedenen Klassen an $G\alpha$ -Untereinheiten

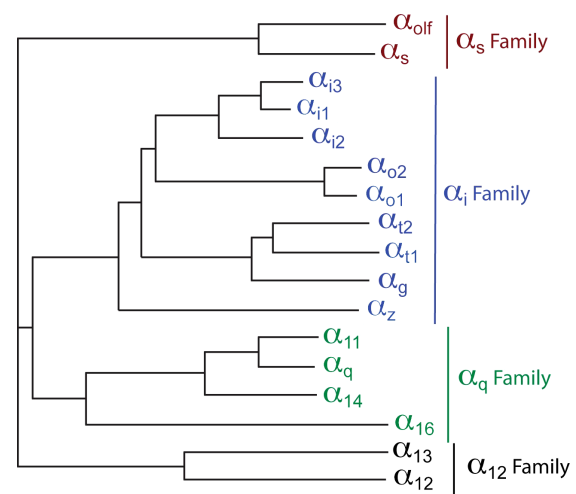


Abb. 15 | Phylogenetische Beziehung humaner $G\alpha$ -UE (modifiziert nach Nehmé et al. 2017)

Die fünf verschiedenen $G\beta$ -Isoformen sind untereinander sehr ähnlich aufgebaut und können, bis auf $G\beta_5$, mit jeder der 12 $G\gamma$ -Isoformen Dimere bilden, obwohl diese Isoformen weniger stark konserviert sind als die der $G\beta$ -UE (Hillenbrand et al., 2015). Bisher ist jedoch wenig darüber bekannt, wie verschiedene $\beta\gamma$ -Dimere die Interaktion der $G\alpha$ -UE mit dem GPCR beeinflussen.

1.2.2 | Struktur der G α -UE und Kreislauf der G-Protein-Aktivierung

Die G α -UE des heterotrimeren G-Proteins besteht aus zwei Hauptstrukturen, der GTPase- und der α -helikalen Domäne, zwischen denen in der inaktiven Form GDP gebunden und eingeschlossen ist (Abb. 16a) (Oldham & Hamm, 2008). Bindet die passende α -UE mit ihrer C-terminalen Helix (α 5-Helix) in die intrazelluläre Bindetasche des aktivierten Rezeptors, kommt es zu einer Rotation und Translation der α 5-Helix tiefer zwischen die transmembranären Helices des Rezeptors (Sören G.F. Rasmussen et al. 2011b). *Molecular-Dynamics* (MD)-Simulationen lassen vermuten, dass sich diese Konformationsänderung auf den β 6/ α 5-Loop in der GTPase Domäne überträgt, der dann die Affinität zu GDP schwächt (Dror et al., 2015). Dieses dissoziiert von der α -UE, sobald die α -helikale Domäne zur Seite klappt, sodass ein hochaffiner Komplex zwischen Agonist, Rezeptor und dem G-Protein in der Nukleotid-freien Form entsteht (Abb. 16b) (Oldham & Hamm, 2008).

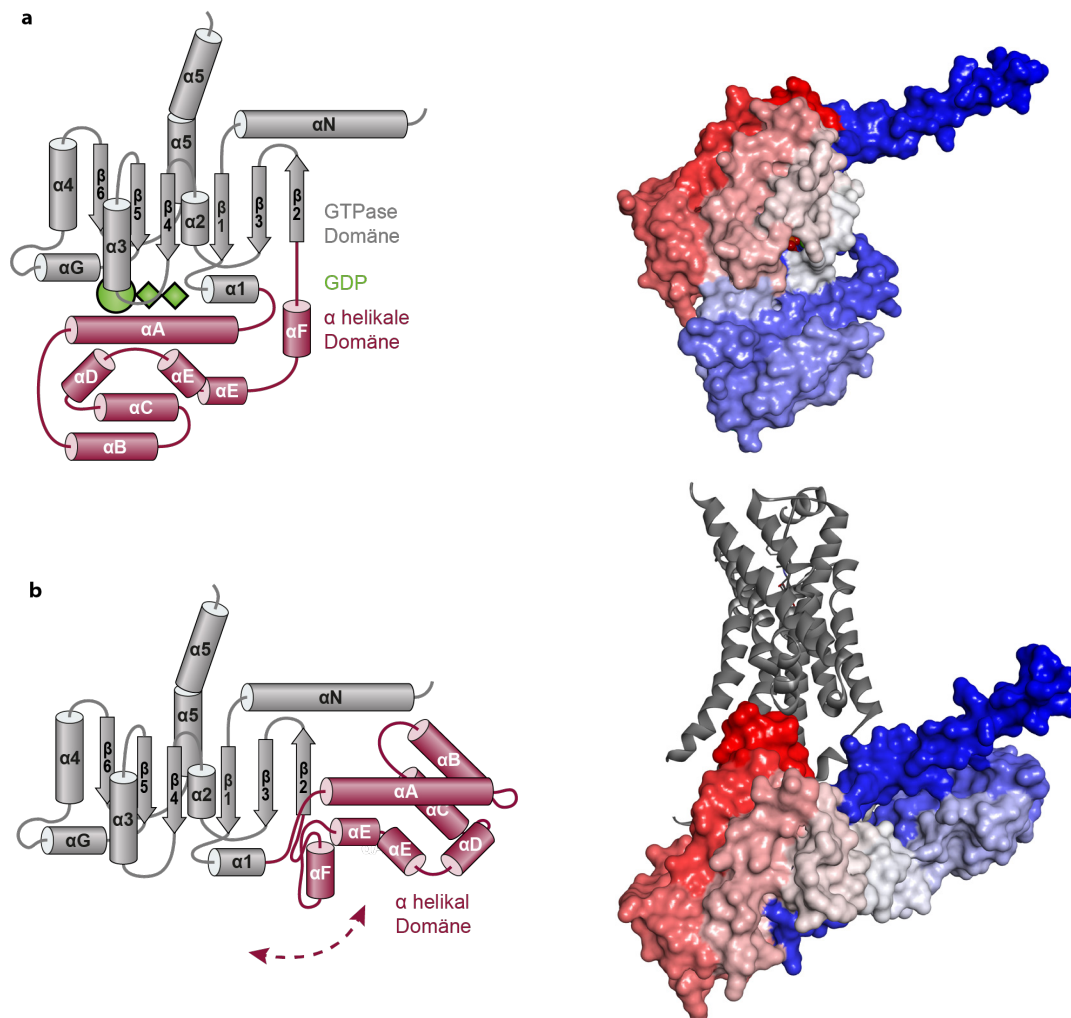


Abb. 16 | Struktur der G α -Untereinheit (farblich von N- nach C-Terminus)

a Zustand der inaktiven G α -UE (Gs, GDP-gebunden, PDB: 6EG8).

b Zustand der aktiven G α -UE unter GTP-freien Bedingungen (β_2 AR-Gs, PDB: 3SN6).

Dieser Nukleotid-freie Komplex ist unter physiologischen Bedingungen extrem kurzlebig, da GTP, das im Zellinneren im Vergleich zu GDP in großem Überschuss vorliegt, sofort von der α -UE gebunden werden kann. Die folgende strukturelle Veränderung sorgt für die Dissoziation der α -UE vom Rezeptor und der gleichzeitigen Trennung von der $\beta\gamma$ -UE. In dieser aktivierten Form kann die $G\alpha$ -UE an verschiedene Effektorproteine, wie z.B. die Phospholipase C (PLC) oder die Adenylcyclase (AC) binden und diese aktivieren oder hemmen, je nachdem zu welcher G-Protein Klasse sie gehört. Signale können jedoch teilweise auch von der $\beta\gamma$ -UE weitergeleitet werden, indem GIRK-Kanäle aktiviert werden, die Kalium in die Zelle einströmen lassen (Senarath et al., 2018). Die Signaltransduktion des G-Proteins erfolgt so lange, bis die α -UE das gebundene GTP zu GDP hydrolysiert hat, was durch die GTPase-Domäne katalysiert wird. Dabei unterscheidet sich die Hydrolysegeschwindigkeit je nach $G\alpha$ -UE und kann auch durch sogenannte RGS-Proteine (Regulators of G protein signaling) verändert werden (Johnston & Siderovski, 2007). Liegt die α -UE schlussendlich wieder in der GDP-gebundenen Form vor, lagert sich das heterotrimere G-Protein erneut zusammen, sodass der G-Protein-Kreislauf (siehe Abb. 17) wieder von vorne starten kann, falls weiterhin aktivierte Rezeptoren vorhanden sind.

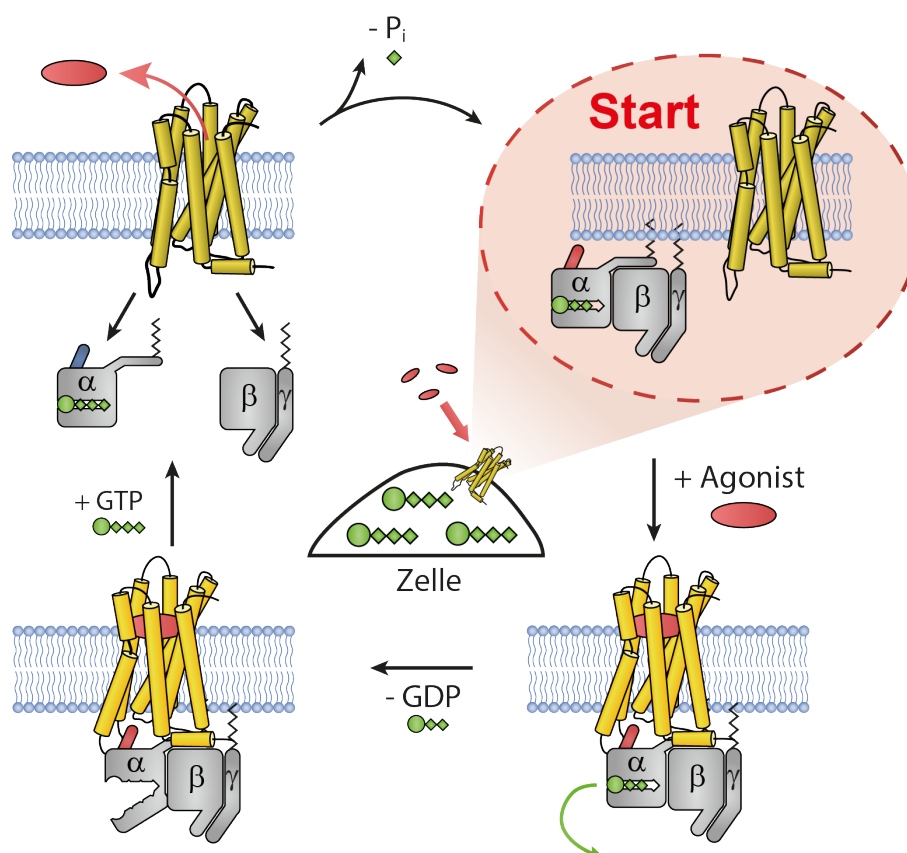


Abb. 17 | Kreislauf der G-Protein-Aktivierung

1.2.3 | G-Protein-Signalwege

Wie schon erwähnt, werden durch die Aktivierung bestimmter G-Proteine verschiedene Signalwege angeschaltet (schematische Zusammenfassung, siehe Abb. 18). Schon vor langer Zeit wurden stimulatorische Gs-Proteine entdeckt, die die Adenylylcyclase (AC) stimulieren (Northup et al., 1980) und damit die Umwandlung von ATP zu cAMP in der Zelle katalysieren (Sunahara et al., 1996). Cyclisches AMP ist ein *Second-Messenger*, der unter anderem die Proteinkinase A (PKA) stimuliert (Syrovatkina et al., 2016), welche wiederum andere zelluläre Proteine, z.B. Ionen-Kanäle phosphorylieren und damit deren Funktion regulieren kann. Cyclisches AMP kann jedoch auch direkte Effekte auslösen, indem es z.B. an HCN-Kanäle (Hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-activated channels) bindet, die unter anderem durch einen Schrittmacherstrom die Herzfrequenz regulieren (Alig et al., 2009). Weiterhin wird die cAMP-Konzentration auch durch Phosphodiesterasen (PDE) reguliert, die cAMP zu AMP spalten (Bizzi et al., 2019).

Inhibitorische Gi/o-Proteine verhalten sich gegensätzlich zu den Gs-Proteinen, indem sie die Adenylylcyclase hemmen und dadurch den cAMP-Spiegel und folglich auch die Aktivität der PKA senken (Sunahara et al., 1996). Weiterhin können die $\beta\gamma$ -Untereinheiten des Gi-Proteins auch direkt GIRK-Kanäle aktivieren, die Kalium einströmen lassen, sodass die Zelle hyperpolarisiert wird (Glaaser & Slesinger, 2015). Durch den Gi-gekoppelten und im Herzen exprimierten M₂-Rezeptor kann deshalb die Herzfrequenz physiologisch bedeutend gehemmt werden, wenn der Parasympathikus diesen aktiviert (Harvey & Belevych, 2003). Warum der Effekt der $\beta\gamma$ -UE vor allem durch Gi-Proteine aber nicht durch andere Klassen vermittelt wird, ist noch nicht vollständig geklärt, jedoch spielen vermutlich kinetische Effekte eine Rolle (Touhara & Mackinnon, 2018). Charakteristisch ist außerdem die Inhibition von Gi/o-Proteinen durch Pertussis-Toxin (PTX), welches einen ADP-Ribosylrest auf das C-terminale Cystein in der $\alpha 5$ -Helix der Gai/o-UE überträgt, sodass die Interaktion mit dem Rezeptor sterisch verhindert wird (Campbell & Smrcka, 2018).

Gq-Proteine sind hingegen für einen eigenen Signalweg verantwortlich, indem sie die Phospholipase C β (PLC β) aktivieren, die das Membranlipid Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) in Diacylglycerol (DAG) und IP₃ (Inositol-1,4,5-trisphosphat) spaltet (Campbell & Smrcka, 2018). IP₃ sorgt nachfolgend für die intrazelluläre Freisetzung von Ca²⁺-Ionen aus dem endoplasmatischen Retikulum, indem es dort den IP₃-Rezeptor, einen Liganden-gesteuerten Calciumkanal, aktiviert, während DAG die Proteinkinase C (PKC) stimuliert (Mizuno & Itoh, 2009). Diese Mechanismen

sind unter anderem für die Kontraktion glatter Muskulatur verantwortlich (Wettschureck & Offermanns, 2005).

Der etwas andersartige Signalweg der G12/13 Proteine aktiviert RhoGEFs (RhoGTPase Nucleotide-Exchange-Factors), wie z.B. p115-RhoGEF, PDZ-RhoGEF oder LARG, die ihrerseits die GTPase RhoA aktivieren (Kozasa et al., 2011). RhoA reguliert wiederum vielfältige Proteine, die auf das Cytoskelett wirken, wozu beispielsweise Rho-Kinasen (ROCKs) zählen, die am Ende über den Serum-Response-Factor (SRF) die Gentranskription beeinflussen, sowie über die Phosphorylierung von „Myosin-Light-Chains“ (MLCs) zur Kontraktion des Cytoskeletts führen (Siehler, 2009).

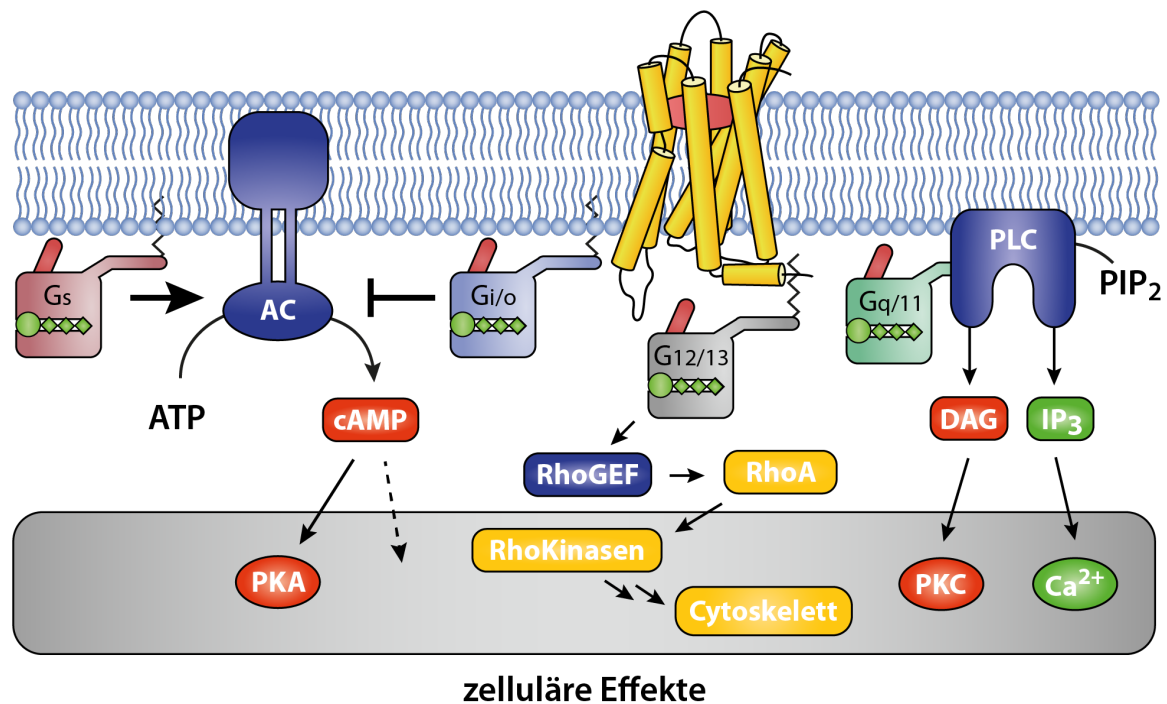


Abb. 18 | G-Protein-Signalwege für Gs, Gi/o, G12/13 und Gq/11

1.2.4 | Kopplungsspezifität zwischen GPCR und G-Protein

Um die richtigen G-Proteine zu selektieren und die gewünschten Signalwege anzuschalten, muss ein GPCR vielfältige $G\alpha$ -Untereinheiten, die gleichzeitig in einer Zelle exprimiert sind, spezifisch erkennen. Normalerweise koppeln GPCRs bevorzugt an eine bestimmten G-Protein-Familie, sie können teilweise aber auch noch zusätzlich mit anderen Klassen interagieren (Inoue et al. 2019). Es wäre daher wünschenswert, herauszufinden, welche Protein-Protein-Erkennungsstrukturen existieren, die die Kopplungsspezifität ermöglichen. Trotz jahrzehntelanger Forschung ist dies jedoch bisher nicht gelungen, weil GPCRs während der Evolution unabhängig voneinander Mechanismen entwickelt haben, dasselbe G-Protein zu erkennen bzw. zu aktivieren. Manche GPCRs konnten in ihrer Evolution den Kopplungsmechanismus beibehalten, während die Ligandenbindung durch Mutationen modifiziert wurde (z.B. olfaktorische GPCRs), wohingegen andere GPCRs ihre Kopplungspartner noch einmal gewechselt haben, nachdem sie die Bindung des Liganden schon fertig entwickelt hatten (z.B. Adrenorezeptoren) (Flock et al., 2017). Beide Wege sind beispielhaft in Abb. 19 dargestellt.

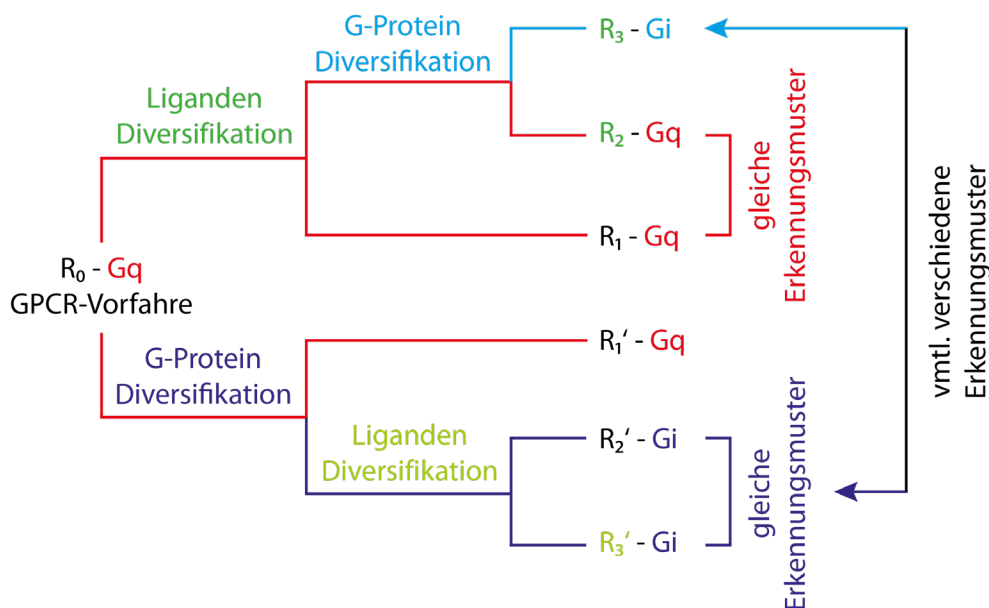


Abb. 19 | Evolution der G-Protein-Kopplung (modifiziert nach Flock et al. 2017)

Strukturelle Einblicke in die G-Protein-Kopplung wurden in den letzten Jahren vor allem durch Cryo-EM-Strukturen von GPCR-G-Protein-Komplexen vorangebracht, sodass mittlerweile für jede der drei bekannteren G-Protein-Klassen (G_s , G_i/o und $G_q/11$) eine Struktur vorhanden ist (J. Wang et al., 2020). Diese bestätigten die langjährige Annahme, dass die C-terminale Helix ($\alpha 5$ -Helix) der $G\alpha$ -Untereinheit in die intrazelluläre Bindetasche von aktivierten GPCRs bindet und

damit unmittelbar an der G-Protein-Aktivierung beteiligt ist. Außerdem haben sie gezeigt, dass die Aufnahme dieser Helix in unterschiedlich große Rezeptorbindetaschen von der Größe abhängig ist, da der zu Gs-Proteinen gehörige C-Terminus sperriger als der schlanke von Gi-Proteinen ist (Maeda et al., 2019). Darüber hinaus wurden auch weitere Interaktionsstellen mit dem Rezeptor außerhalb des α -C-Terminus identifiziert. Das sind vor allem der α N/ β 1- und der β 2/ β 3-Loop, die mit dem intrazellulären Loop 2 (ICL2) des Rezeptors interagieren können (Preininger et al., 2013; J. Wang et al., 2020). Die Cryo-EM-Strukturen lieferten bislang jedoch keine klassenspezifischen Erkenntnisse für die selektive Erkennung bestimmter G α -UE durch GPCRs. Um zu untersuchen, ob es diese Klasseneffekte aufgrund der evolutionär unterschiedlich entwickelten Kopplungsmechanismen überhaupt gibt, eignet sich der Vergleich von Strukturen desselben Rezeptors mit jeweils zwei verschiedenen G-Proteinen. Es ist jedoch schwierig, die Struktur eines GPCR-Komplexes mit einer fremden G-Protein-Klasse zu bestimmen, da dieser Komplex (falls überhaupt möglich) deutlich instabiler ist als mit dem präferierten Kopplungspartner. Aktuell sind deshalb nur die Strukturen des Glucagon-Rezeptors in Komplex mit G α i oder G α s verfügbar (Qiao et al., 2020). In diesen Nukleotid-freien Strukturen nimmt der ICL2 des Rezeptors verschiedene Konformationen ein, was letztlich zu unterschiedlichen Interaktionen mit der C-terminalen α N-Helix bzw. dem α N/ β 1-Loop der α -UE führt (Abb. 20). Die Ergebnisse konnten mangels weiterer Strukturen jedoch bisher noch nicht mit einem anderen Rezeptor verglichen werden. Außerdem gehört der Glucagon-Rezeptor zu den Klasse B Rezeptoren, die mutmaßlich einen minimal abgewandelten Aktivierungsmechanismus besitzen als Klasse A Rezeptoren (Hilger et al., 2020), sodass sich diese Ergebnisse vermutlich nicht allgemein auf die deutlich weiter verbreitete Gruppe der Rhodopsin-ähnlichen GPCRs übertragen lassen.

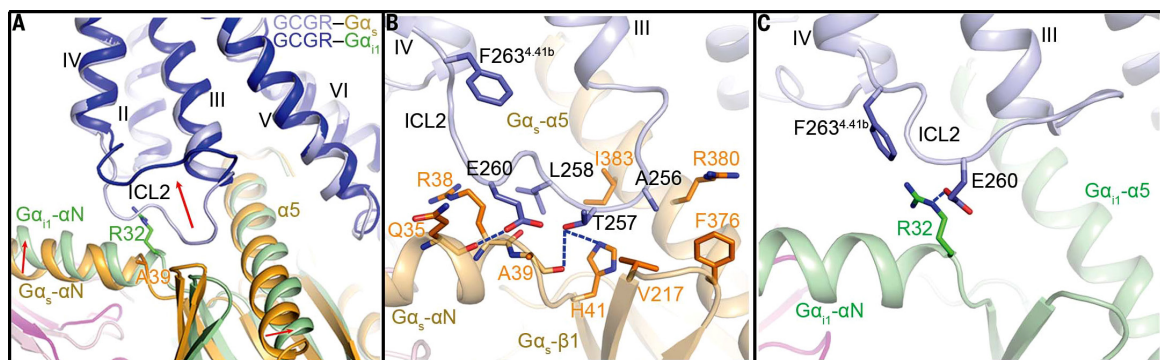


Abb. 20 | ICL2 vermittelte G-Protein-Interaktionen des Glucagon-Rezeptors (Qiao et al., 2020)

A Vergleich der ICL2-Konformationen in der Glucagon-GCGR-Gs und Glucagon-GCGR-Gi1-Struktur.

B-C Interaktionen zwischen ICL2 und Gas (B) bzw. Gai1 (C).

Strukturen von GPCR-G-Protein-Komplexen sind jedoch nur Momentaufnahmen, die nicht die ganze zeitliche Abfolge von Kopplungsereignissen abbilden können und deren Nukleotid-freie Zustände in lebenden Zellen nur extrem kurzzeitig existieren. Zwei aktuelle Studien weisen außerdem auf das Auftreten von intermediären Zuständen vor dem Erreichen des in den Strukturen abgebildeten Zustands hin, die ganz andere Konformationen besitzen (z.B. eine um 45° rotierte α -UE) und daher schon initial als Selektivitätsfilter fungieren könnten (Du et al., 2019; Kato et al., 2019).

Funktionelle Studien wurden in der Vergangenheit klassischerweise nur indirekt durch die Detektion von *Second-Messengern* durchgeführt, die jedoch keinen quantitativen Vergleich verschiedener Signalwege zuließen und auch durch unspezifische Signale entstanden sein könnten (Blahos et al., 2001; Conklin et al., 1993; Kostenis, Degtyarev, et al., 1997; Kostenis, Gomeza, et al., 1997). Daher ermöglichten sie keine zuverlässige Vorhersage von strukturellen Elementen, die zur Kopplungsspezifität beitragen. Erst eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte mit Hilfe direkter BRET-Bindungsexperimente zeigen, dass Gi-gekoppelte Rezeptoren für die Bindung der G α -UE spezifischer auf präferierte C-Termini angewiesen sind, als Gs- oder Gq-gekoppelte GPCRs, die ihre Kopplungsspezifität überwiegend durch Strukturen außerhalb des C-Terminus in der G α -UE ausüben (Abb. 21) (Okashah et al., 2019). Durch die fehlende Analyse von Kinetiken lässt sich die Bindung von G-Proteinen an GPCRs in dieser biochemischen Studie, die zudem ausschließlich auf den C-Terminus beschränkt ist, jedoch nicht hundertprozentig zuverlässig quantifizieren.

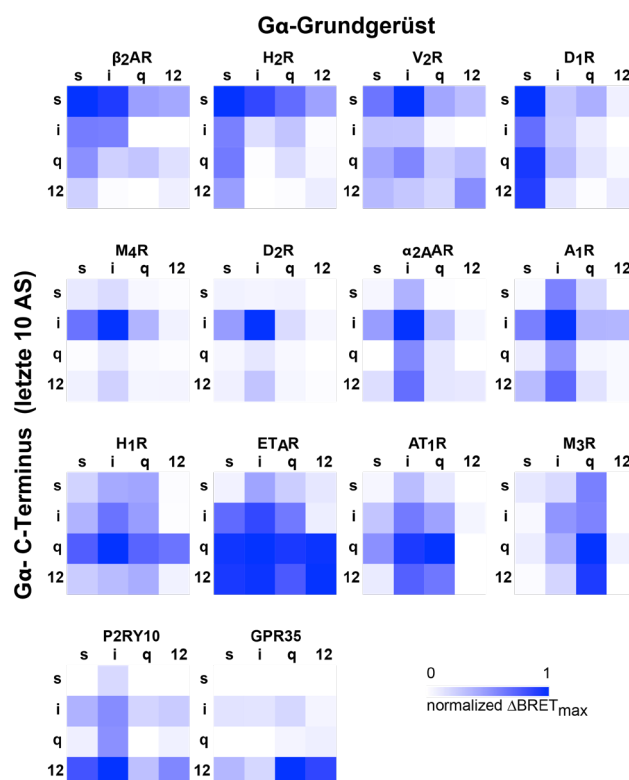


Abb. 21 | Bindung von C-terminal modifizierten G α -Chimären an GPCRs

(Okashah et al., 2019)

BRET-Amplituden wurden in GTP-freien Zellen zwischen GPCR-Luziferase und YFP-Gy bestimmt.

Sortierung:

Gs-gekoppelte (oben), Gi-gekoppelte (2. Reihe), Gq-gekoppelte (3. Reihe) und G12-gekoppelte-Rezeptoren (unten).

Einfluss auf Kopplungsfähigkeit:

GPCRs links:

= selektieren stärker über C-Termini

GPCRs rechts:

= selektieren weniger über C-Termini

1.2.5 | Signalabschaltung durch GRK und Arrestin

Damit die Signaltransduktion von GPCRs beendet oder reduziert werden kann, können dem Rezeptor die endogenen Liganden wieder entzogen werden. Der Abbau des Neurotransmitters ACh aus dem synaptischen Spalt geschieht z.B. durch die Acetylcholin-Esterase, während andere Neurotransmitter wie Noradrenalin, Dopamin und Serotonin durch die Monoaminoxidase (MAO) nach der Wiederaufnahme in die Zelle abgebaut werden (Nair et al., 1993).

Als weitere Möglichkeit, die Signaltransduktion abzuschalten, können GPCRs, wie eingangs in *Abb. 13* gezeigt, nicht nur mit G-Proteinen interagieren, sondern auch von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRKs) an den intrazellulären Domänen phosphoryliert werden. Davon sind insbesondere Serin- und Threonin-Reste am C-Terminus und am ICL3 des Rezeptors betroffen (Nakata et al., 1994). Die cytosolisch vorkommende GRK2 und GRK3 müssen dafür erst zur Membran rekrutiert werden, was durch die Bindung an freie G $\beta\gamma$ -UE geschieht, die nach Aktivierung des G-Proteins von aktivierten G α -UE dissoziieren. Andere GRK-Unterklassen sind dagegen durch polybasische Reste an negativ geladene Phospholipide der Membran assoziiert (Campbell & Smrcka, 2018). Phosphorylierte GPCRs können dann von Arrestin gebunden werden, welches einerseits die Bindetasche für G-Proteine sterisch blockiert und andererseits die Internalisierung des Rezeptors von der Zelloberfläche veranlasst (Sente et al., 2018). Beide Mechanismen dienen physiologisch dem Schutz der Zelle vor einer Dauerstimulation.

Aktuell wird diskutiert, ob Arrestin nicht sogar selbst einen eigenen G-Protein-unabhängigen Signalweg anschaltet, der möglicherweise auch für unerwünschte Arzneimittelwirkungen verantwortlich ist (W. Wang et al., 2018). Neuere Studien gehen jedoch davon aus, dass der Signalweg, der Arrestin zugeschrieben wurde, auch durch G-Proteine vermittelt wird (Grundmann et al., 2018). Dieses Thema wird aktuell jedoch noch kontrovers diskutiert.

1.3 | Ziel dieser Arbeit

G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) stellen mit ca. 800 Individuen die größte menschliche Rezeptorgruppe dar, die erstaunlicherweise nur an vier verschiedene G-Protein-Klassen (Gs, Gi/o, Gq/11, G12/13) koppelt, welche ihrerseits unterschiedliche Signalwege in der Zelle aktivieren (Bjarnadóttir et al., 2006; Simon et al., 1991). GPCRs interagieren bevorzugt mit einer dieser G-Protein-Familien, können jedoch teilweise auch zusätzlich an fremde G-Proteine koppeln (Ilyas-kina et al., 2018; Inoue et al., 2019). Da Vertreter aller vier G-Protein-Klassen in jeder Zelle exprimiert sind, müssen sie als Kopplungspartner selektiv von GPCRs erkannt werden, damit sichergestellt ist, dass auch nur die spezifischen Signalwege für die entsprechende physiologische Funktion aktiviert werden. Bisher ist jedoch wenig darüber bekannt, welche Protein-Protein-Erkennungsstrukturen existieren, die die Kopplungsspezifität ermöglichen, da trotz jahrelanger Forschung noch kein genereller Mechanismus entdeckt worden ist.

Im ersten Teil dieser Arbeit sollten daher bisher wenig untersuchte strukturelle Elemente in G-Proteinen, also auch jenseits des $G\alpha$ -C-Terminus, hinsichtlich der selektiven Erkennung und der anschließenden Aktivierung durch den M_3 -Rezeptor erforscht werden. Anhand des H_1 -Rezeptors sollte dann überprüft werden, ob die identifizierten Regionen, die wichtig für die Kopplung an den M_3 R waren, auch von anderen Gq-gekoppelten Rezeptoren erkannt werden. Zu diesem Zweck wurden die Bindungsstabilitäten von chimären Gq- und Go-Proteinen an diesen Rezeptoren mit Hilfe von FRET-Messungen in permeabilisierten Zellen untersucht, indem Dissoziationskinetiken von Nukleotid-freien Rezeptor-G-Protein-Komplexen miteinander verglichen wurden. Nachfolgend wurden außerdem die Aktivierungspotenzen der $G\alpha$ -Chimären in intakten Zellen durch Auswerten von Konzentrations-Wirkungskurven untersucht, die letztlich die physiologisch relevanten Kopplungseffizienzen widerspiegeln.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden dagegen strukturelle Elemente im Rezeptor bestimmt, die die Kopplungspräferenzen gegenüber verschiedenen G-Proteinen beeinflussen sollten. Dazu wurden unter anderem Punktmutationen in den M_3 R eingeführt. Darüber hinaus wurde auch der ICL3 herausgeschnitten und chimär mit dem M_2 R vertauscht, sowie die Helix 8 mit dem M_2 R chimär getauscht.

Kapitel 2: Materialien

2.1 | Geräte

In *Tabelle 1* sind alle Laborgeräte aufgeführt, die für diese Arbeit verwendet wurden.

Accu-jet pro	Brand, Wertheim
Autoklav (Vertikaler Standautoklav VX-95)	Systec GmbH, Linden
Eismaschine Ice flaker F100 Compact Incubator	Icematic, Düsseldorf
Feinwaage 770 (precision balance)	KERN & Sohn, Balingen-Frommern
FiveEasy pH Meter	Mettler Toledo, Gießen
Gefrierschrank (-80 °C) FORMA 900 Series	Thermo Scientific, Dreieich
Hitzesterilisator	Thermo Scientific, Dreieich
Inkubator APT.line TM C150	Binder, Tuttlingen
Magnetrührer MR Hei-Standard	Heidolph Instruments, Schwabach
Mikrowelle	Sharp
NanoPhotometer	Implen, München
PCR-Maschine (Labcycler Gradient)	SensoQuest, Göttingen
Pipetten Gilson Pipetman	Gilson, Limburg-Offheim
Sterilwerkbank Esco ac2-4e8-tu sentinel gold	Esco Technologies, Inc., Hatboro, USA
Sterilwerkbank LabGard ES NU 437- 400E Klasse II	NuAire, Plymouth, USA
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Vortex – Genie 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Zentrifuge (Heraeus Fresco 17)	Thermo Scientific, Dreieich
Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16R)	Thermo Scientific, Dreieich

Tabelle 1 | Laborgeräte

In *Tabelle 2* sind alle Bestandteile aufgelistet, die im Zusammenhang mit dem Mikroskop-Setup von Visitron-Systems für Experimente verwendet wurden.

Attofluor™ Cell Chamber	Invitrogen (Thermo Fisher), Darmstadt
CCD-Kamera: Spot Pursuit	Spot Imaging / Diagnostic Instruments, Sterling Heights, USA
Dichroischer Strahlenteiler im Optosplit: 505LP	Chroma, Bellows Falls, USA
Druckluftgefederter Tisch	Newport Corp., Stahnsdorf
Emissionsfilter im Optosplit: CFP: 470/24 YFP: 525/39	Chroma Semrock, Rochester, NY, USA
Filterblock: Messfilter Anregungsfilter: 436/20 Dichroischer Strahlenteiler: 458LP	Chroma Semrock
Filterblock: direkte YFP-Anregung Dualband-Anregungsfilter: 416/501 Dichroischer Strahlenteiler: 440/520 Dualband-Emissionsfilter: 464/547	Semrock Semrock Semrock
LED-Lichtquellen: pE-100 (440 nm, 500 nm)	CoolLED, Andover, UK
Mikromanipulator: MMJ	Märzhäuser, Wetzlar
Mikroskop: Axiovert 100	Zeiss, Oberkochen
Objektiv: PlanApo N 60x/1.45 Oil	Nikon, Japan
Perfusionssystem: ALA VC3-8xP	ALA Scientific Instruments, Farmingdale, NY, USA

Tabelle 2 | Mikroskop („Visitron-Setup“)

2.2 | Software

Internetseiten

Viele Informationen über GPCRs und G-Proteine wurden der Datenbank gpcrdb.org entnommen. Für pharmakologische Eigenschaften von GPCRs und deren Liganden wurde die Internetseite <https://www.guidetopharmacology.org> genutzt.

<i>Plasmideditoren, DNA-Alignments:</i>	SnapGene Viewer 5, ApE (A Plasmid Editor)
<i>Datenanalyse und Statistik:</i>	VisiView (Visitron-Systems), Microsoft Excel, OriginPro 2018 (OriginLab), GraphPad Prism 8.3
<i>Visualisierung von Protein-Strukturen:</i>	Discovery Studio Visualizer 2017
<i>Zeichnen und modifizieren von Vektorgrafiken:</i>	Adobe Illustrator 2020
<i>Literaturverwaltung:</i>	Mendeley 1.19.6

2.3 | Verbrauchsmaterialien

In *Tabelle 3* sind allgemeine Verbrauchsmaterialien aus Glas und Kunststoff aufgelistet.

Deckgläschen (25mm, rund)	VWR, Darmstadt
Einmalspritzen	Neolab, Heidelberg
Eppendorf-Gefäße	Sarstedt, Nürnbrecht
Parafilm	Brand, Wertheim
Pasteurpipetten	Hartenstein, Würzburg
PCR-Reaktionsgefäße	VWR, Darmstadt
Pipettenspitzen (1 ml)	Gilson (Germany), Limburg-Offheim
Pipettenspitzen (2 µl, 200 µl)	Sarstedt, Nürnbrecht
Whatman-Filter (GE Healthcare)	VWR, Darmstadt
Zellkulturschalen (6 und 10 cm, 6-Wells)	Sarstedt, Nürnbrecht
Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle 3 | Verbrauchsmaterialien

2.4 | Chemikalien

In *Tabelle 4* sind allgemeine Reagenzien aufgeführt, die im Labor verwendet wurden.

Acetylcholin-Iodid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Aktivkohle	Carl Roth, Karlsruhe
Ascorbinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim
Calciumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Carbachol (Carbamoylcholin-Chlorid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Sigma-Aldrich, Steinheim
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
EGTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Carl Roth, Karlsruhe
Ethanol	Carl Roth, Karlsruhe
GTP γ S	Sigma-Aldrich, Steinheim
HEPES	Carl Roth, Karlsruhe
Histamin	Alfa Aesar, Kandel
Immersionsöl (Immersol 518F)	Zeiss, Jena
Isopropanol	Carl Roth, Karlsruhe
Kaliumaspartat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumhydroxid-Lsg 1N	Merck, Darmstadt
Magnesiumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid	Carl Roth, Karlsruhe
Noradrenalin-Tartrat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Pertussis-Toxin	Merck, Darmstadt
Salzsäure (HCl 37%)	Carl Roth, Karlsruhe
Saponin	Applchem, Darmstadt

Tabelle 4 | Allgemeine Reagenzien

In *Tabelle 5* sind alle Reagenzien, Enzyme und Kits aufgeführt, die für molekularbiologische Methoden genutzt wurden, die der Generierung von neuen Plasmiden dienen.

1 kb / 100 bp DNA-Leiter	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Agar	Applichem, Darmstadt
Agarose (LE)	Biochrom, Berlin
Ampicillin	Applichem, Darmstadt
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Ethidiumbromid	Promega, Walldorf
Gibson Assembly® Cloning Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Kanamycinsulfat	Carl Roth, Karlsruhe
LB-Medium nach Lennox	Applichem, Darmstadt
NEB® 5-alpha Competent <i>E. coli</i>	New England Biolabs, Frankfurt am Main
NEBuilder® HiFi DNA Assembly Kit	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Q5-DNA-Polymerase	New England Biolabs, Frankfurt am Main
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiaquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzyme	New England Biolabs, Frankfurt am Main
RNAse A	Roche, Mannheim
T4-Ligase	New England Biolabs, Frankfurt am Main

Tabelle 5 | Reagenzien, Enzyme und Kits für Klonierungen

In *Tabelle 6* sind Reagenzien aufgeführt, die für die Zellkultur genutzt wurden.

DMEM (High Glucose, 4,5 g/L)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
Effectene® Transfection Reagent Kit	Qiagen, Hilden
FCS (fetales Kälberserum)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
L-Glutamin (200 mM)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
PBS	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
Penicillin / Streptomycin 100x	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund
Poly-(L)-Lysin-Hydrobromid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Trypsin-EDTA (0,05%)	Capricorn-Scientific, Ebsdorfergrund

Tabelle 6 | Reagenzien und Kits für die Zellkultur

2.5 | Plasmide

In *Tabelle 7* sind alle allgemeinen Plasmide aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden und auf denen neu klonierte Konstrukte, die in nachfolgenden Tabellen genannt sind, basieren. Die Plasmide liegen in einem pcDNA3-Vektor vor, falls es nicht abweichend beschrieben ist.

Plasmide	Spezies	Referenz
α_2A -mCit	Maus	Diese Arbeit: Fluorophor in α_2A -YFP (Bünemann et al., 2003) gegen mCitrine getauscht.
Goq-Chimären	Ratte (Großteil)	Diese Arbeit: kloniert auf Basis von Gao-C351I mit AS von Gaq
Gqo-Chimären	Maus (Großteil)	Diese Arbeit: kloniert auf Basis von Gaq mit AS von Gao-C351I
GRK2-mCit	Mensch	Diese Arbeit: Fluorophor in GRK2-YFP (Wolters et al., 2014) gegen mCitrine getauscht
Gao-C351I	Ratte	(Frank et al., 2005)
Gao-C351I-YFP	Ratte	(Frank et al., 2005)
Gao-WT (PTX-sensitiv)	Ratte	Diese Arbeit: Punktmutation in Gao-C351I rückmutiert zu WT
Gaq-WT	Maus	(Hughes et al., 2001)
Gaq-YFP	Maus	(Hughes et al., 2001)
G β_1 -WT	Mensch	(Bünemann et al., 2003)
H ₁ R-mCit	Mensch	Diese Arbeit: mCit analog zum M ₃ R-YFP (Hoffmann et al., 2012) C-terminal an H ₁ R-WT angehängt
H ₁ R-WT	Mensch	(Lutz et al., 2005)
M ₂ R-mCit	Mensch	Diese Arbeit: Fluorophor in M ₂ R-YFP gegen mCitrine getauscht, analog zu M ₃ R-mCit
M ₂ R-WT	Mensch	(Roseberry et al., 2001)
M ₃ R-mCit	Mensch	Diese Arbeit: Fluorophor in M ₃ R-YFP (Hoffmann et al., 2012) gegen mCitrine getauscht
M ₃ R-WT	Mensch	cDNA Resource Center (www.cDNA.org)
mTurq2-G γ_2 (Clontech-Vektor: N1-eCFP)	Rind	Diese Arbeit: Fluorophor in CFP-G γ_2 (Bünemann et al., 2003) gegen mTurq2 getauscht
pcDNA3	-	Invitrogen, Darmstadt

Tabelle 7 | Liste von allgemeinen Plasmiden

In *Tabelle 8* sind alle in dieser Arbeit klonierten chimären Goq- und Gqo-Konstrukte aufgeführt, einschließlich der Aminosäuren, die durch die jeweils andere G-Protein-Klasse ersetzt worden sind.

Plasmid		Anzahl an AS	Ort	Getauschte AS	Position (CGN)
GoqN	GqoN	34 / 40	$\alpha N - \beta 1$	Go: M1 – V34 Gq: M1 – L40	G.HN.01 – G.S1.02
Goq1	Gqo1	11	$\alpha N - \beta 1$	Go: K24 – V34 Gq: R30 – L40	G.HN.48 – G.S1.02
Goq2	Gqo2	6	$\beta 2 - \beta 3$	Go: T191 – H196 Gq: D195 – I200	G.S2.07 – G.S3.02
Goq4	Gqo4	9	$\alpha 4 - \beta 6$	Go: K311 – I319 Gq: L316 – I324	G.H4S6.01 – G.S6.01
GoqC11	GqoC11	11	$\alpha 5$	Go: I344 – Y354 Gq: L349 – V359	G.H5.16 – G.H5.26
GoqC22	GqoC22	22	$\alpha 5$	Go: Q333 – Y354 Gq: R338 – V359	G.H5.05 – G.H5.26
GoqC22-11		11	$\alpha 5$	Go: Q333 – I343 Gq: R338 – T347	G.H5.05 – G.H5.15

Tabelle 8 | Chimäre Ga-Konstrukte

In *Tabelle 9* sind alle molekularbiologisch veränderten Plasmide muskarinerger Rezeptoren aufgelistet, in denen größere Abschnitte an Aminosäuren getauscht oder deletiert wurden.

Plasmid	Anzahl an AS	Ort	Veränderte AS	Position (Ballesteros-Weinstein)
M ₂ H8M ₃ -mCit	22 → 42	H8 – C-Terminus	M ₂ : A445 – R466 ersetzt durch M ₃ : K549 – L590	8.48 – Ende
M ₃ H8M ₂ -mCit	42 → 22	H8 – C-Terminus	M ₃ : K549 – L590 ersetzt durch M ₂ : A445 – R466	8.48 – Ende
M ₃ ICL3M ₂ -mCit	245 → 185	TM5 – TM6	M ₃ : Y251 – A495 ersetzt durch M ₂ : Y206 – A391	5.58 – 6.39
M ₃ ΔICL3-mCit	196	ICL3	Deletion von A275 – K470 aus M ₃ -mCit	ΔICL3

Tabelle 9 | Chimäre GPCR-Konstrukte

In *Tabelle 10* sind alle Plasmide des M₃Rs aufgeführt, in die Punktmutationen eingeführt wurden.

Plasmid	Anzahl an AS	Ort	Position (Ballesteros-Weinstein)
M ₃ S169C	1	TM3	3.53
M ₃ R177P	1	ICL2	34.54
M ₃ Y255S	1	TM5	5.62
M ₃ E257A	1	TM5	5.64
M ₃ E259K	1	TM5	5.66
M ₃ A489V	1	TM6	6.33
M ₃ A490T	1	TM6	6.34
M ₃ L493I	1	TM6	6.37
M ₃ S494L	1	TM6	6.38
M ₃ 4-fach Mutante: A489V, A490T, L493I S494L (AALS → VTIL)	4	TM6	6.33 – 6.34 & 6.37 – 6.38

Tabelle 10 | Punktmutierte M₃R-Konstrukte

2.6 | PCR-Primer

PCR-Primer wurden von Eurofins Genomics in HPSF-Qualität (high-purity salt free) synthetisiert. Die Prinzip zur Erstellung von PCR-Primern, die in dieser Arbeit für verschiedene Klonierstrategien verwendet wurden, ist im Methodenteil unter 3.3 | *Klonierstrategien* beschrieben. Folgende Primer wurden in dieser Arbeit verwendet (*Tabelle 11*).

#	Oligoname	PCR-Template	Primersequenz	Klonierung
1	M3 Y255S	M ₃ R-YFP	TTA TAC TGG AGG ATC TCT AAG GAA ACT GAA AAG (33 bp)	Punktmutation in TM5
2	M3 E257A	M ₃ R-YFP	GGA GGA TCT ATA AGG CAA CTG AAA AGC GTA C (31 bp)	Punktmutation in TM5
3	M3 E259K	M ₃ R-YFP	ATC TAT AAG GAA ACT AAA AAG CGT ACC AAA G (31 bp)	Punktmutation in TM5
4	M3 E257A E259K	M ₃ R- E259K	GGA GGA TCT ATA AGG CAA CTA AAA AGC GTA C (31 bp)	zweite Punktmutation in TM5
5	M3 T258S	M ₃ R-YFP	GAG GAT CTA TAA GGA ATC TGA AAA GCG TAC CA (32 bp)	Punktmutation in TM5
6	M3 S169C	M ₃ R-YFP	TTG ACA GAT ACT TTT GCA TCA CGA GGC CGC TC (32 bp)	Punktmutation in TM3
7	M3 R177P	M ₃ R-YFP	GGC CGC TCA CGT ACC CAG CCA AAC GAA CAA C (31 bp)	Punktmutation in ICL2
8	8. M3 A489V	M ₃ R-YFP	TCA AGG AGA AGA AAG TGG CCC AGA CCC TCA G (31 bp)	Punktmutation in TM6
9	9. M3 A490T	M ₃ R-YFP	AAG GAG AAG AAA GCG ACC CAG ACC CTC AGT G (31 bp)	Punktmutation in TM6
10	10. M3 L493I	M ₃ R-YFP	AAA GCG GCC CAG ACC ATC AGT GCG ATC TTG C (31 bp)	Punktmutation in TM6
11	11. M3 S494L	M ₃ R-YFP	GCG GCC CAG ACC CTC CTT GCG ATC TTG CTT GC (32 bp)	Punktmutation in TM6
12	12. M3 4 Mut. (#8-#11)	M ₃ R-YFP	GGA GAA GAA AGT GAC CCA GAC CAT CCT TGC GAT CTT GC (38 bp)	4 Punkt- mutationen in TM6
21	Gq → Go- 11As-fw	Gq-WT	GTC AAG GAC ACC ATC ATC GCG AAC AAC CTG AGG GGG TGC GGT CTG TAC TAA GCG GCC GCT CG (62 bp)	Punktmutationen zu GqoC11 (PTX- sensitiv)
22	Go → Gq- 11As-fw	Go-C351I	GTC ACC GAC ATC ATC CTT CAG CTC AAT CTC AAG GAG TAC AAT TTG GTC TAA TCT AGA GGG CC (62 bp)	Punktmutationen zu GoqC11
23	M3-fw del ICL3	M ₃ R-YFP	ATC TTG CTT GCC TTC ATC AT (20 bp)	Gibson Assem. Vektor fw für M ₃ ICL2M ₂

24	M3-rw del ICL3	M ₃ R-YFP	TAA AAT AGT CAT AAT GGT GAC AGG C (25 bp)	Gibson Assem. Vektor rv für M ₃ ICL2M ₂
25	M2ICL3 in M3 fw	M ₂ R-YFP	ATT ATG ACT ATT TTA TAT TGG CAC ATA TCC CGA GCC A (37 bp)	Gibson Assem. Fragment fw für M ₃ ICL2M ₂
26	M2ICL3 in M3 rv	M ₂ R-YFP	GAA GGC AAG CAA GAT AGC CAA GAT TGT CCT GGT G (34 bp)	Gibson Assem. Fragment rv für M ₃ ICL2M ₂
27	M3 K485R fw	M ₃ R-YFP	GGA TGT CCC TGG TCA GGG AGA AGA AAG CGG C (31 bp)	Punktmutation in TM6
29	A489V A490T fw	M ₃ R-YFP	TCA AGG AGA AGA AAG TGA CCC AGA CCC TCA GTG (33 bp)	zweite Punktmutation in TM6
31	YFP → Cit Q69M fw	YFP	TTC GGC TAC GGC CTG ATG TGC TTC GCC CGC TAC (33 bp)	Mutation von YFP zu Citrine
33	Citrin A206K fw	Citrine	CTG AGC TAC CAG TCC AAG CTG AGC AAA GAC CCC (33 bp)	Mutation von Citrine zu mCitrine
35	M2 S255Y fw (255 entspricht M ₃)	M ₂ R-YFP	TAT ATT GGC ACA TAT ACC GAG CCA GCA AGA G (31 bp)	Punktmutation in TM5 (S210Y)
36	M2 S255Y rv (255 entspricht M ₃)	M ₂ R-YFP	CTC TTG CTG GCT CGG TAT ATG TGC CAA TAT A (31 bp)	Punktmutation in TM5 (S210Y)
37	mTurq I146F fw	mTurq1	CTG GAG TAC AAC TAC TTT AGC GAC AAC GTC TA (32 bp)	Mutation von mTurq1 zu mTurq2
39	Go4 I351C fw	Go C351I	AAC AAT CTC CGG GGT TGC GGT TTG TAC TAA TCT (33 bp)	Punktmutation zu Go-WT (PTX-sensitiv)
41	Goq6 fw	Go-WT	CAT TGC CAA CAA TCT CAA GGA GTA CAA TTT GGT CTA ATC TAG AGG (45 bp)	Punktmutationen zu GoqC6 als Zwischenschritt
42	Goq6 rv	Go-WT	CCT CTA GAT TAG ACC AAA TTG TAC TCC TTG AGA TTG TTG GCA ATG (45 bp)	Punktmutationen zu GoqC6 als Zwischenschritt
43	Goq11 fw	GoqC6	GTCACCGACATCATCCTTCAGCTCAATCTCA AGGAG TAC (39 bp)	Punktmutationen zu GoqC11
44	Goq11 rv	GoqC6	GTACTCCTTGAGATTGAGCTGAAGGATGAT GTCGG TGAC (39 bp)	Punktmutationen zu GoqC11
45	Gqo PTX insensitiv fw	GqoC11 (PTX sensitiv)	GAACAACCTGAGGGGGATCGGTCTGTACTA AGC (33 bp)	GqoC11 PTX-insensitiv

46	Gqo PTX insensitiv rv	GqoC11 (PTX sensitiv)	GCTTAGTACAGACCGATCCCCCTCAGGTTG TTC (33 bp)	GqoC11 PTX- insensitiv
47	XhoI Goq fw	GoqC11	AAAAACTCGAGGGGCGTGGAGTATGGTGAC AA (32 bp)	für Teil, der hinter YFP käme für GoqC11-YFP
48	Goq NotI rv	GoqC11	AAAAAGCGGCCGCTTAGACCAAATTGTACT CCTTG AG (37 bp)	für Teil, der hinter YFP käme für GoqC11-YFP
49	M3 ΔICL3 fw	M ₃ R-mCit	AGCCTCTGGGACAGAGACCAGAAGTCAGAT C (31 bp)	Deletion des ICL3 zu M ₃ ΔICL3
50	M3 ΔICL3 rv	M ₃ R-mCit	GATCTGACTTCTGGTCTCTGTCCCAGAGGCT (31 bp)	Deletion des ICL3 zu M ₃ ΔICL3
51	Go-YFP delta 1. Xho	Go-YFP	GAG AGA GCC GCC CTG GAG CGG AGC AAG (27 bp)	1. XhoI wegmutiert, damit 2. XhoI spezifisch geschnitten werden kann
56	M3 R552K fw	M ₃ R-mCit	TGCAACAAAACATTCAAAACCACTTTCAAG ATG (33 bp)	Punktmutation in H8
57	BamHI-M3 fw	M ₃ ΔICL3- mCit	AAAAAAGGATCCATGAC CTTGCACAAT (27 bp)	mCit rausschneiden zu M ₃ ΔICL3
58	M3 wt-Stopp- NotI	M ₃ ΔICL3- mCit	AAAAAAGCGGCCGCTTACAAGGCCTGCTCG GGT (33 bp)	mCit rausschneiden zu M ₃ ΔICL3
60	Gqo D195- I200 to T191- H196	Gq-WT	GGATCATCGAATACCCCTTTACCTTTAAAAA TCTCCATTTTCAGAATGGTCGATGT AGG (58 bp)	6-fache Punkt- mutation für Gqo2
61	Gqo L316- I324 to K311- I319	Gq-WT	CTGAAAATGTTCGTGGACAAGAACCGCAGC CCTAACAAAGAGATCTACTCCCACTTCACGT G (62 bp)	6-fache Punkt- mutation für Gqo4
62	Goq K24-V34 to R30-L40	direkt als Fragment verwendet	AGG CGA TTG AGA AAA ATC TCA GAA GAG ATA AGA GAG ACG CCC GCA GAG AGC TGA AAT TAC TCC TGC TGG GG (71 bp)	ssDNA-Primer als Gibson Assembly Frag. für Goq1
63	Goq T191- H196 to D195-I200	Go-C351I	CAT CGT AGA AAC CCA CTT CGA CTT GCA GAG CGT CAT CTT CAG GCT GTT TGA CGT TG (56 bp)	6-fache Punkt- mutation für Goq2
64	Goq K311- I319 to L316- I324	Go-C351I	CAG TTT GAA AGC CTA AAC CCC GAC TCC GAC AAA ATA ATT TAC TGT CAC ATG ACT TGT (66 bp)	6-fache Punkt- mutation für Goq4

80	Goq1 rv	direkt als Fragment verwendet	CCCCAGCAGGAGTAATTTTCAGCTCTCTGCG GGCGTCTCTCTTATCTCTTCTGAGATTTTTC TCAATCGCCT (71 bp)	ssDNA-Primer als Gibson Assembly Frag. für Goq1
81	HindIII-Go fw	Go-C351I	AAAAAAAGCTTATGGGA TGTACTCTGAGCG (30 bp)	vor Go „Müll- DNA“ heraus- schneiden
82	Go-XbaI rv	Go-C351I	AAAAAATCTAGATTAGTACAAACCTATACC CCG (33 bp)	vor Go „Müll- DNA“ heraus- schneiden
83	Goq-XbaI rv	GoqC11	AAAAAATCTAGATTAGACCAAATTGTACTC CTTGAG (36 bp)	„Müll-DNA“ rausklonieren hinter Stoppcodon
85	Goq1 vector fw neu	Go-C351I	ATTACTCCTGCTGGGGG CTG (20 bp)	Gibson Assem. Vektor für Goq1
86	Goq1 vector rv neu	Go-C351I	AGATTTTCTCAATCGCC TTGCTCC (25 bp)	Gibson Assem. Vektor für Goq1
87	Gqo5 Y261- N266 to N257-D262	Gq-WT	CTCTTTAGAACAATTATCACCAACAAGTTCT TCATCGACTCCTCTGTGATTCT GTTC (57 bp)	5-fache Punkt- mutation zu Gqo5
88	Goq5 N257- D262 to Y261-N266	Go-C351I	CTTCGACTCCATCTGTAACCTACCCCTGGTTC CAGAATACCTCCATCATTCTCT TCC (56 bp)	5-fache Punkt- mutation zu Goq5
89	Gq N222D (Gqo6)	Gq-WT	ATACACTGCTTTGAAGATGTCACCTCCATC (30 bp)	Punktmutation zu Gqo6
90	Go D218N (Goq6)	Go-C351I	ATCCACTGCTTCGAGAATGTCACGGCCATC (30 bp)	Punktmutation zu Goq6
91	91 GqoN vector fw	Gq-WT	CAAAGACGTGAAGCTGCTGCTGCTGGG (27 bp)	Gibson Assem. Vektor für GqoN
92	92 GqoN GoqN vector rv	Gq-/Go- C351I bindet an pcDNA3	GTAAGCAGTGGGTTCTCTAGTTAGCC (26 bp)	Gibson Assem. Vektor für GqoN/GoqN
93	93 GqoN GoqN frag fw	Gq-/Go- C351I bindet an pcDNA3	AGAACCCACTGCTTACTGGCT (21 bp)	Gibson Assem. Frag. für GqoN/GoqN
94	94 GqoN frag rv	Go-C351I	CAGCTTCACGTCTTTGGCGGCG (22 bp)	Gibson Assem. Frag. für GqoN
95	95 GoqN vector fw	Go-C351I	GAGCTCAAATTACTCCTGCTGGGGGCT (27 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqN
96	96 GoqN frag rv	Gq-WT	GCAGGAGTAATTTGAGCTCCCGGCGGG (27 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqN

103	103 GqoC22 vec fw	Gq-WT	GTATAGGTTTGTACTAAGCGGCCGCTCGAG (30 bp)	Gibson Assem. Vektor für GqoC22
104	104 GqoC22 vec rv	Gq-WT	CACCTGGATGTTCTCGGTATCTGTGGCG (28 bp)	Gibson Assem. Vektor für GqoC22
105	105 GqoC22 frag fw	Go-C351I	CGAGAACATCCAGGTGGTATTCGACGCC (28 bp)	Gibson Assem. Frag. für GqoC22
106	106 GqoC22 frag rv	Go-C351I	CGCTTAGTACAAACCTATACCCCGGAGATT GT (32 bp)	Gibson Assem. Frag. für GqoC22
107	107 GoqC22 vec fw	Go-C351I	CAATCTGGTCTAATCTAGAGGGCCCTATTCT ATAGTGTAC (41 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqC22
108	108 GoqC22 vec rv	Go-C351I	GAAGCGGATATTATTCGTGTCTGTGGCACA AGTC (34 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqC22
109	109 GoqC22 frag fw	Gq-WT	CACGAATAATATCCGCTTCGTCTTTGCAGC (30 bp)	Gibson Assem. Frag. für GoqC22
110	110 GoqC22 frag rv	Gq-WT	CCTCTAGATTAGACCAGATTGTACTCCTTCA GGTTC (36 bp)	Gibson Assem. Frag. für GoqC22
111	111 M3H8M2 vec fw	M ₃ R/M ₂ R- mCit (bindet in mCit)	TACGGCAAGCTGACCCTGAAG (21 bp)	Gibson Assem. Vektor für M ₃ H8M ₂ / M ₂ H8M ₃
112	112 M3H8M2 vec rv	M ₃ R-mCit	TTGAAGGTGGCGTTGCACAGAGCATAGCAC ACG (33 bp)	Gibson Assem. Vektor für M ₃ H8M ₂
113	113 M3H8M2 frag fw	M ₂ R-mCit	CTGTGCAACGCCACCTTCAAGAAGACCTTT AAACAC (36 bp)	Gibson Assem. Frag. für M ₃ H8M ₂
114	114 M3H8M2 frag rv	M ₂ R/M ₃ R- mCit (bindet in mCit)	CTTCAGGGTCAGCTTGCCGTAG (22 bp)	Gibson Assem. Frag. für M ₃ H8M ₂ / M ₂ H8M ₃
118	118 M2H8M3 vec rv	M ₂ R-mCit	GTTCTGAATGTTTTATTGCAAAGTGCATAGC AGGCAG (37 bp)	Gibson Assem. Vektor für M ₂ H8M ₃
119	119 M2H8M3 frag fw	M ₃ R-mCit	CTTTGCAATAAAACATTCAGAACCACCTTCA AGATGCTG (39 bp)	Gibson Assem. Frag. für M ₂ H8M ₃
120	120 HindIII- H1R fw	H ₁ R-WT	AAAAA AAGCTT ACC ATGAGCCTCCCC (26 bp)	H ₁ R amplifiziert zu H ₁ R-mCit
121	121 XbaI- H1R rv (ohne Stopp)	H ₁ R-WT	AAAAATCTAGAGGAGCGAATATGCAGAATT CTCTTG (36 bp)	H ₁ R amplifiziert zu H ₁ R-mCit
122	122 HindIII- PtxA fw	PtxA	AAAAA AAGCTT ATGGACGATCCTCCCGC (28 bp)	PtxA in pcDNA3 kloniert

123	123 PtxA-XbaI rv	PtxA	AAAAA TCTAGA ACGAATACGCGATGCTTTC (30 bp)	PtxA in pcDNA3 kloniert
124	124 GoqN vec fw	Go-C351I	CGGGAAC TCAAATTACTCCTGCTGGGGGCT (30 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqN
125	125 GoqN vec rv	Go-C351I	CCAGAGTCATCGGATCCGAGCTCGGTA (27 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqN
126	126 GoqN frag fw	Gq-WT	CTCGGATCCGATGACTCTGGAGTCCATCAT GGC (33 bp)	Gibson Assem. Frag. für GoqN
127	127 GoqN frag rv	Gq-WT	GGAGTAATTTGAGTTCCCGGCGGGC (25 bp)	Gibson Assem. Frag. für GoqN
128	128 GoqC22 vec fw	Go-C351I	GTACAATCTGGTCTGAGCGGCCGCTCTAGA G (31 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqC22
129	129 GoqC22 vec rv	Go-C351I	AAGCGGATATTATTCGTGTCTGTGGCACAA G (31 bp)	Gibson Assem. Vektor für GoqC22
130	130 GoqC22 frag fw	Gq-WT	GACACGAATAATATCCGCTTCGTCTTTGCAG C (32 bp)	Gibson Assem. Frag. für GoqC22
131	131 GoqC22 frag rv	Gq-WT	CCGCTCAGACCAGATTGTACTCCTTCAGGTT CAG (34 bp)	Gibson Assem. Frag. für GoqC22
132	GoqC22-11 vec fw	Go-C351I	CTTCGTCTTTGCAGCCGTCAAGGACACCATC ATTGCCAACAAATCTCCGGG (50 bp)	Gibson Assem. Vektor inkl. Frag. für GoqC22-11
133	GoqC22-11 vec rv	Go-C351I	TGACGGCTGCAAAGACGAAGCGGATATTAT TCGTGTCTGTGGCACAAAGT (49 bp)	Gibson Assem. Vektor inkl. Frag. für GoqC22-11

Tabelle 11 | PCR-Primer (DNA-Oligonukleotide)

2.7 | Prokaryotische und Eukaryotische Zelllinien

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden in dieser Arbeit *E. coli* Bakterien vom Stamm DH5α verwendet.

Als eukaryotische Zelllinie wurden adhärent wachsende HEK293T-Zellen (tsa201) genutzt, die aus dem Labor von Prof. Martin Lohse (Universität Würzburg) stammen und von ATCC gekauft wurden. Die Zellen wurden jährlich negativ auf Mykoplasmen-Kontamination getestet.

2.8 | Hergestellte Puffer / Lösungen

DMEM-Supplementation für eukaryotische Zellen

Dulbecco's Modified Eagle's Medium wurde als standardisiertes Nährmedium mit folgenden Reagenzien ergänzt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert:

1 Flasche (450 ml)	DMEM (High Glucose, 4,5 g/l)
+ 5,5 ml (= 2 mM)	L-Glutamin (200 mM)
+ 5,5 ml (100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin)	Penicillin / Streptomycin 100x
+ 50 ml (10%)	FCS

Tabelle 12 | DMEM-Supplementation

Stammlösungen

Für Mikroskopierexperimente wurden Stammlösungen angesetzt, aliquotiert und eingefroren.

Acetylcholin	10 mM in H ₂ O, zu 10 µl aliquotiert, bei -20 °C gelagert
Carbachol	5 mM in externem Puffer, bei -20 °C gelagert
Histamin	100 mM in DMSO (aus Stabilitätsgründen), bei -20 °C gelagert
GTPγS	1 mM in H ₂ O, zu 5 µl aliquotiert, bei -80 °C gelagert

Tabelle 13 | Stammlösungen

Saponin-Lösung

Zur Permeabilisierung der Zellen wurde eine 0,075% Saponin-Lösung angesetzt, indem 15 mg Saponin eingewogen und in 20 ml internem Puffer gelöst wurden.

Externer Puffer

Externer Puffer sollte das physiologisch extrazelluläre Milieu nachahmen und wurde für Experimente mit intakten Zellen verwendet. Nach der Herstellung wurde der Puffer mit **NaOH**-Lösung auf pH = 7,3 eingestellt und steril / Partikel-frei filtriert.

Menge	Stammlösung	Reagenz	Endkonzentration
27,4 ml	5 M	NaCl	137 mM
5,4 ml	1 M	KCl	5,4 mM
2 ml	1 M	CaCl ₂	2 mM
1 ml	1 M	MgCl ₂	1 mM
2,38 g	-	HEPES	10 mM
ad 1000 ml	-	H ₂ O	-

Tabelle 14 | Rezeptur: externer Puffer*Interner Puffer*

Interner Puffer sollte das physiologisch intrazelluläre Milieu nachahmen und wurde für Experimente mit permeabilisierten Zellen verwendet. Nach der Herstellung wurde der Puffer mit **KOH** auf pH = 7,3 eingestellt und steril / Partikel-frei filtriert.

Menge	Stammlösung	Reagenz	Endkonzentration
17,12 g	-	K ⁺ -Aspartat	100 mM
30 ml	1 M	KCl	30 mM
2 ml	5 M	NaCl	10 mM
1 ml	1 M	MgCl ₂	1 mM
2,38 g	-	HEPES	10 mM
1,9 g	-	EGTA	5 mM
ad 1000 ml	-	H ₂ O	-

Tabelle 15 | Rezeptur: interner Puffer

KCM-Puffer 5x

Für die Transformation in chemisch kompetente *E. coli* wurde KCM-Puffer benötigt, der in sterilem Reinstwasser hergestellt und bei 4 °C im Kühlschrank gelagert wurde.

3,73 g (500 mM)	KCl
1,66 g (150 mM)	CaCl ₂
2,38 g (250 mM)	MgCl ₂
ad 100 ml	H ₂ O

Tabelle 16 | Rezeptur: KCM-Puffer

LB-Medium (flüssig)

Zur Herstellung von flüssigem LB-Nährmedium für Bakterien (1% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 0,5% NaCl) wurden 100 g LB-Medium nach Lennox in 5 L Reinstwasser gelöst, zu 500 ml in Flaschen abgefüllt und direkt autoklaviert.

100 g	LB-Medium nach Lennox
ad 5 l	H ₂ O
	zu 500 ml abfüllen und autoklavieren

Tabelle 17 | Rezeptur: LB-Medium (flüssig)

LB-Agar (fest)

Zur Herstellung von Agarplatten wurde festes LB-Nährmedium angesetzt, indem zu 250 ml des zuvor genannten flüssigen LB-Mediums noch 3,75 g Agar (Endkonzentration: 1,5%) pro Flasche und ein Rührfisch hinzugefügt wurden. Danach wurde alles direkt autoklaviert.

250 ml	LB-Medium (flüssig)
3,75 g (1,5%)	Agar
	in 500 ml Flaschen abfüllen und autoklavieren

Tabelle 18 | Rezeptur: LB-Agar (fest)

Ampicillin-Stammlösung 1000x

Die Ampicillin-Stammlösung 1000x wurde zu 100 mg/ml hergestellt, in 1 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Zur Selektion wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 100 µg/ml verwendet.

2 g (100 mg/ml)	Ampicillin
ad 20 ml	H ₂ O
	zu 1 ml aliquotieren

Tabelle 19 | Rezeptur: Ampicillin 1000x*Kanamycin-Stammlösung 1000x*

Die Kanamycin-Stammlösung wurde zu 50 mg/ml hergestellt, in 1 ml Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20 °C eingefroren. Zur Selektion wurde Kanamycin in einer Endkonzentration von 50 µg/ml verwendet.

500 mg	Kanamycinsulfat
ad 10 ml	H ₂ O
	zu 1 ml aliquotieren

Tabelle 20 | Rezeptur: Kanamycin 1000x*TAE-Puffer 50x*

Für ein Agarose-Gel wurde TAE-Puffer benötigt, in dem die Agarose gelöst wurde und das die Leitfähigkeit während der Elektrophorese sichergestellt hat. Es wurde als 50x Stammlösung ange-
setzt und vor Gebrauch 1:50 verdünnt (40 mM Tris-Acetat, 1 mM EDTA).

242 g	Tris-base
700 ml	H ₂ O
57,1 ml	Eisessig
100 ml	0,5 M EDTA (pH 8,0 durch NaOH)
ad 1 L	im Messkolben mit H ₂ O auffüllen

Tabelle 21 | Rezeptur: TAE-Puffer 50x

Kapitel 3: Methoden

3.1 | Zellkultur

Alle im Folgenden beschriebenen Methoden der Zellkultur wurden unter aseptischen Bedingungen unter einer Laminar-Airflow-Sterilwerkbank durchgeführt.

3.1.1 | Kultivierung von HEK293T-Zellen

HEK293T-Zellen wurden in DMEM-Nährmedium (4,5 g/l Glucose), supplementiert mit 10 % FCS, 2 mM L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 0,1 mg/ml Streptomycin, im Inkubator auf 37 °C in einer feuchten 5% CO₂ Atmosphäre kultiviert. Sie wurden zum Ausdünnen montags (ca. 1:20) oder freitags (ca. 1:10) auf eine neue 10 cm Zellkulturschale gesplittet. Dazu wurde das alte Nährmedium abgesaugt und die Zellen für kurze Zeit mit 2 ml Trypsin- / EDTA-Lsg. (0,05%) abgelöst. Die Trypsinaktivität wurde durch die Zugabe von 10 ml frischem Medium gestoppt, mit dem die abgelösten Zellen heruntergespült und in ein Zentrifugierröhrchen überführt wurden. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei 1000 U/min wurde der Überstand abgesaugt, das Zellpellet in 5 ml frischem Medium resuspendiert und ein Teil davon neu ausgesät.

Für Mikroskopierexperimente wurden die Zellen montags oder freitags zusätzlich auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät (1:10 bis 1:40), in denen sie zwei Tage vor dem Experiment transfiziert werden konnten. 24 Stunden nach der Transfektion wurden sie von den 6 cm Schalen auf Deckgläschen in 6-Well-Platten (1:25 pro Well) umgesetzt, die wiederum am nächsten Tag mikroskopiert wurden, wie in *Tabelle 22* veranschaulicht ist.

Freitag	Samstag	Sonntag	Montag	Dienstag	Mittwoch	Donnerstag	Freitag
Splitten 1:10	Transfektion	Splitten in 6-Well	Messtag				
Splitten 1:20		Transfektion	Splitten in 6-Well	Messtag			
Splitten 1:40			Transfektion	Splitten in 6-Well	Messtag		
			Splitten 1:10	Transfektion.	Splitten in 6-Well	Messtag	
			Splitten 1:20		Transfektion	Splitten in 6-Well	Messtag

Tabelle 22 | Zellkulturkalender für FRET-Experimente

3.1.2 | Transfektion von HEK293T-Zellen

Für eine transiente Transfektion wurden Zellen mit Hilfe des Effectene® Transfection Reagent Kits transfiziert. Dazu wurden sie, wie in *Tabelle 22* dargestellt, so auf 6 cm Zellkulturschalen gesplittet, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von etwa 50 - 75% aufwiesen.

Nach dem Pipettieren der gewünschten Plasmid-DNA in ein Eppendorfgesäß, wurden 150 µl EC-Puffer und 16 µl Enhancer hinzugegeben und miteinander vermischt. Nach einer Inkubationszeit von 3 Minuten wurden 20 µl Effectene dazugegeben, mit dem restlichen Transfektionsansatz vermischt und für weitere 7 Minuten inkubiert. Die Lösung wurde dann mit etwas überstehendem Medium der Zellen verdünnt und anschließend vorsichtig auf die Zellen getropft. 24 Stunden später wurde die Transfektion durch das Splitten auf beschichtete Deckgläschen in 6-Well-Platten gestoppt.

3.1.3 | Beschichtung von Deckgläschen mit Poly-L-Lysin

Vor dem Splitten der transfizierten Zellen in 6-Well-Platten wurden die Wells mit Deckgläschen bestückt, die mit dem kationischen Polymer Poly-L-Lysin (PLL) beschichtet wurden. Dadurch konnten die negativ geladenen Zellen besser auf der positiv geladenen Polymer-Beschichtung der Deckgläschen haften, als direkt auf dem glatten Glas.

Zur Sterilisation wurden die Deckgläschen zuerst in 70% Ethanol eingetaucht und danach in PBS-gefüllte 6-Well-Platten gelegt, um die Ethanolreste abzuwaschen. Nach dem Absaugen der Flüssigkeit wurden mehrere Tropfen PLL-Lösung auf jedes Deckgläschen aufgetragen und alles für mindestens 30 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde das PLL wieder von den Deckgläschen abgesaugt und mit PBS-Puffer gewaschen, um die für Zellen toxischen PLL-Rückstände zu entfernen. Nach dem Absaugen des PBS-Puffers wurden die 6-Well-Platten mit den beschichteten Deckgläschen im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.4 | Pertussis-Toxin Vorbehandlung

Zur Inaktivierung von endogen exprimierten Gi/o-Proteine, wurden Zellen für Kontrollexperimente über Nacht mit Pertussis-Toxin (PTX) vorbehandelt. Dabei wurden 0,55 µl der PTX-Glycerol-Lösung (0,2 mg/ml) nach dem Splitten auf 6-Well-Platten direkt in jedes Well gegeben, sodass eine Konzentration von 50 ng/ml PTX pro Well erreicht wurde. Am nächsten Morgen konnten die Zellen dann mikroskopiert werden.

3.2 | Molekularbiologische Methoden

3.2.1 | PCR

Für diese Arbeit wurden Polymerasekettenreaktionen zur Vervielfältigung von DNA, aber auch zur Modifizierung von DNA-Enden durchgeführt. Dazu wurde ein DNA-*Template* durch zwei Primer (DNA-Oligonukleotide) von vorne und hinten eingegrenzt, sodass der Abschnitt dazwischen mit Hilfe der PCR amplifiziert werden konnte. Die Primer wiesen jeweils eine ausreichende Anzahl komplementärer Basen zum Vorwärts- oder Rückwärtsstrang auf, um sich an die DNA anlagern zu können und wurden mit Hilfe des kostenlosen Plasmid-Editors „Snapgene Viewer“ so konstruiert, dass ihre Schmelztemperaturen 5 °C unter der gewünschten Annealingtemperatur lagen. Das genaue Primerdesign wird jeweils unter 3.3 | Klonierstrategien erklärt. Für die PCR wurde die Q5-DNA-Polymerase von NEB eingesetzt, da sie sehr schnell und durch eine Korrekturlesefunktion auch sehr zuverlässig DNA polymerisieren kann. Zur Amplifikation kürzerer DNA-Stücke wurde ein 25 µl Ansatz und für Mutagenesen oder Vektor-PCRs, bei denen fast das ganze Plasmid vervielfältigt werden musste, ein 50 µl Ansatz nach folgendem Schema auf Eis pipettiert.

	<i>Insert-PCR</i>	<i>Vektor-PCR</i>
H ₂ O	16,5 µl	32,5 µl
Q5 reaction buffer 5x	5 µl	10 µl
Fw-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl	2,5 µl
Rv-Primer (10 pmol/µl)	1,25 µl	2,5 µl
DNA- <i>Template</i>	0,2 µl (1 µg/µl)	1 µl (0,01 g/µl)
dNTPs 10 mM	0,5 µl	1 µl
NEB Q5-Polymerase	0,25 µl	0,5 µl
Gesamt	25 µl	50 µl

Tabelle 23 | Rezeptur: PCR

Da kürzere DNA-Stücke, die im kleineren 25 µl Ansatz verwendet wurden, auf einem Agarose-Gel per Elektrophorese vom *Template* abgetrennt werden konnten, wurde das *Template* dort unverdünnt (1 µg/µl) eingesetzt. Sollten lange DNA-Sequenzen im 50 µl Ansatz vervielfältigt werden, wurde es dagegen 1:100 (auf 0,01 µg/µl) verdünnt, um eine spätere Verunreinigung zu minimieren, da es auf einem Gel nicht vom Zielkonstrukt unterschieden werden konnte.

Nach dem Pipettieren wurde die PCR nach folgendem Protokoll durchgeführt.

Temp.	25 µl Ansatz (ab 1 h)		50 µl Ansatz (ca. 6 h)		Reaktionsschritt
98 °C	3 min		3 min		Initiale Denaturierung
98 °C	10 sek	30x	10 sek	35x	Denaturierung
65 °C (variabel)	20 sek		20 sek		Primeranlagerung
72 °C	10-90 sek (30 sek kb/min)		8 min (1 kb/min)		Elongation
72 °C	5 min		5 min		Endelongation
4 °C	∞		∞		Kühle Aufbewahrung

Tabelle 24 | PCR-Protokolle

Das Prinzip der exponentiellen DNA-Vermehrung durch mehrere Thermozyklen ist in *Abb. 22* dargestellt. Im ersten Schritt wird die DNA bei 98 °C denaturiert, sodass sich ihr Doppelstrang auf trennt. Nach der Temperatursenkung auf die in dieser Arbeit meistens als Annealingtemperatur verwendeten 65 °C, können sich die DNA-Primer anlagern, die anschließend bei 72 °C von der DNA-Polymerase verlängert werden, sodass sich wieder doppelsträngige DNA bildet. Durch Wiederholung dieser Schritte erfolgt die exponentielle Amplifizierung der gewünschten DNA. Darüber hinaus können die DNA-Enden mit einem gezielten Primerdesign so modifiziert werden, dass z.B. gewünschte Restriktionsschnittstellen eingebaut werden.

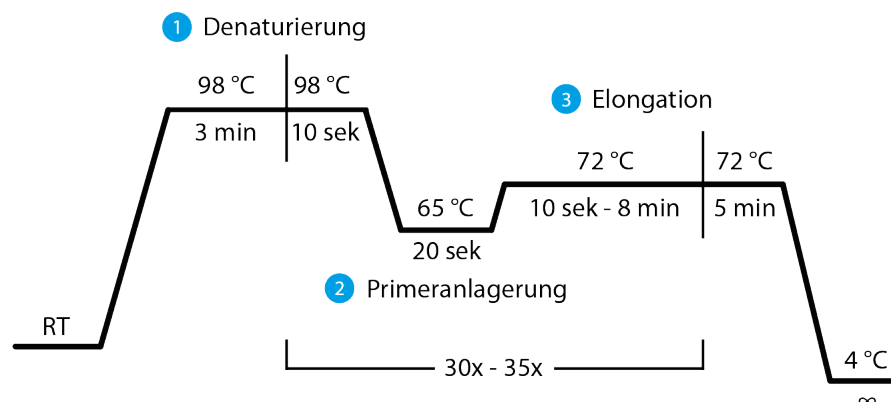


Abb. 22 | PCR-Schema

3.2.2 | Restriktionsverdau

Um Plasmid-DNA spezifisch zu schneiden, wurden Restriktionsenzyme verwendet, die die DNA anhand bestimmter Palindromsequenzen erkennen und zerteilen. Falls die Schnittstellen der einzufügenden DNA bei einer Subklonierung durch eine PCR modifiziert werden mussten (siehe 3.2.1), wurde vor dem Verdau eine Agarose-Gelelektrophorese mit anschließender Gel-Extraktion vorgeschaltet (siehe 3.2.3, 3.2.4). Für einen Restriktionsverdau wurde die gewünschte DNA dann für 1 h bei 37 °C unter leichtem Schütteln nach folgendem Protokoll verdaut.

	Direktverdau	Verdau nach PCR
DNA	3 µl Plasmid-DNA	25 µl nach PCR, Agarose-Gel und Gel-Extraktion
Puffer 10x (Cutsmart)	2 µl	3 µl
Enzym 1 (z.B. XbaI)	1 µl	1 µl
Enzym 2 (z.B. HindIII)	1 µl	1 µl
H ₂ O	ad 20 µl	-

Tabelle 25 | Rezeptur: Restriktionsverdau

3.2.3 | Agarose-Gelelektrophorese

Um ein DNA-Gemisch nach einem Restriktionsverdau (siehe 3.2.2) nach Fragmentgrößen aufzutrennen, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Dazu wurde ein Gemisch aus 1% Agarose in TAE-Puffer so lange in der Mikrowelle erhitzt, bis eine klare flüssige Lösung entstand, die danach zu einem Gel mit Taschen zur Probenbeladung gegossen wurde. Bevor das Gel erstarrte, wurde es mit einem Tropfen Ethidiumbromidlösung versetzt, das die Detektion von DNA-Banden unter UV-Licht ermöglichte. Nach dem Erkalten wurde das Gel in die Elektrophoresekammer gelegt, die mit TAE-Puffer aufgefüllt wurde. Die DNA-Proben wurden mit violetterm Glycerol-haltigen 6x Ladepuffer vermischt, der die Dichte der Proben erhöhte, um das Beladen der Gel-Taschen zu vereinfachen und die Laufweite während der Elektrophorese anzuzeigen. Als Referenz wurde eine DNA-Leiter in eine eigene Tasche aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 80 V für etwa 45 min, sodass sich die negativ geladenen DNA-Fragmente bei ihrer Wanderung zum Pluspol nach ihrer Größe auftrennten, da kleinere DNA-Fragmente das Gel schneller durchlaufen können.

Die Detektion der Banden erfolgte anschließend unter UV-Licht, da das Ethidiumbromid, das in die DNA interkaliert, unter UV-Licht fluoresziert, wie in *Abb. 23* beispielhaft dargestellt ist. Bei Bedarf wurden die gewünschten Banden dann aus dem Gel herausgeschnitten.

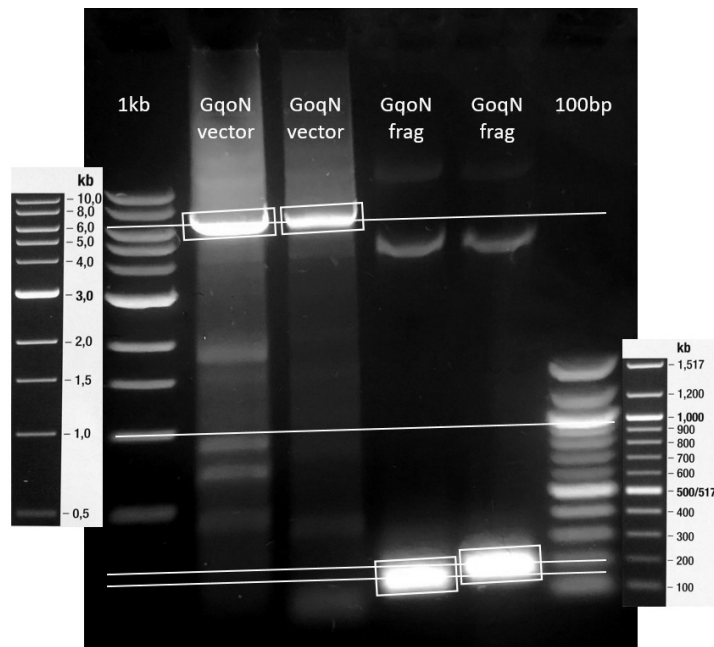


Abb. 23 | Agarose-Gel unter UV-Licht

3.2.4 | Gel-Extraktion

Um DNA-Fragmente, die in einem Agarose-Gel aufgetrennt wurden (siehe 3.2.3), für Klonierungen weiterzuverwenden, wurde die DNA mit Hilfe des Qiaquick Gel Extraction-Kits wieder aus dem Gel extrahiert. Dafür wurde die dreifache Menge QG-Puffer zum Gelstückchen hinzupipettiert (600 µl bei 200 mg Gel) und dieses für ca. 10 min bei 50 °C im Thermomixer aufgelöst. Das Gemisch wurde auf eine kleine Säule gegeben und für 1 min bei 13.300 U/min zentrifugiert, sodass es die Säule durchlaufen konnte. Die an die Säule gebundene DNA wurde mit Ethanol-basiertem PE-Waschpuffer zweimal in der Zentrifuge gewaschen und die Säule anschließend noch einmal leer zentrifugiert, um Ethanolreste zu entfernen. Die Säule wurde dann in ein neues Eppendorfgefäß gestellt und mit 30 µl Reinstwasser für 1 min bei 37 °C inkubiert und anschließend durch Zentrifugation eluiert.

3.2.5 | Ligation

Um DNA-Fragmente nach dem Verdau durch Restriktionsenzyme, der nachfolgenden Abtrennung auf einem Agarose-Gel und anschließender Gel-Extraktion (siehe 3.2.2, 3.2.3, 3.2.4) wieder miteinander zu verbinden, wurde das Enzym T4 DNA-Ligase verwendet. Komplementäre *Sticky-ends*, also einzelsträngige DNA-Überhänge, sorgten dafür, dass sich die Enden zweier Fragmente zusammenlagern konnten. Dabei enthielt ein DNA-Fragment an seinen jeweiligen Enden zwei verschiedene Schnittstellen, damit es nur in einer Richtung ligiert werden konnte, wie schematisch in Abb. 24 dargestellt ist.

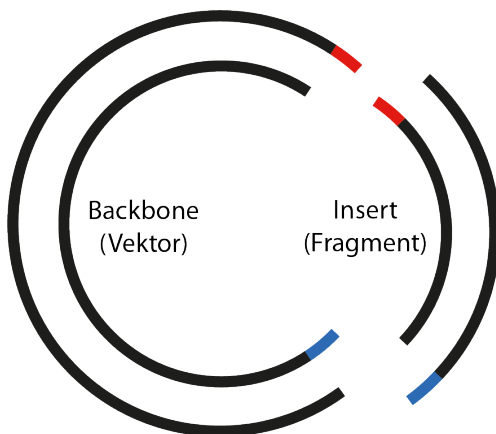


Abb. 24 | Ligation

Für die Ligation wurde folgender Ansatz, dessen Mengen von den DNA-Konzentrationen der Fragmente abhängen, mit einem Überschuss des *Inserts* pipettiert und entweder bei 16 °C über Nacht oder bei Raumtemperatur für 10 min inkubiert.

Ca. 2 µl (3-5x Überschuss)	<i>Insert</i>
Ca. 4 µl (100 – 300 ng)	<i>Backbone</i> (Vektor)
2 µl	Ligase Puffer 10x
1 µl	T4 Ligase
ad 20 µl	H ₂ O

Tabelle 26 | Rezeptur: Ligation

Danach wurde der Ansatz in chemisch kompetente *E. coli* Bakterien transformiert (siehe 3.2.8).

3.2.6 | Kultivierung von *E. coli* Bakterien

Zum Kultivieren von *E. coli* Bakterien und gleichzeitigem Vereinzeln von Bakterienkolonien (Klonen) wurden LB-Agar-Platten gegossen, indem LB-Agar (siehe 2.8) in der Mikrowelle verflüssigt, abgekühlt, mit Selektionsantibiotikum versetzt und in sterile Plastikschaalen gegossen wurde. Nach dem Ausplattieren von Bakterien auf den abgekühlten und festgewordenen Agar-Platten und anschließender Inkubation über Nacht bei 37 °C, konnten gezielt Einzelkolonien gepickt werden, um sie weiter zu vermehren. Dazu wurde flüssiges LB-Medium mit Selektionsantibiotikum in einem Erlenmeyerkolben mit einer Einzelkolonie angeimpft und bei 37 °C auf dem Schüttler über Nacht inkubiert, sodass die Bakterien sich in großer Menge vermehren konnten.

3.2.7 | Generierung chemisch kompetenter *E. coli*

Damit *E. coli* Bakterien plasmidische DNA aufnehmen konnten, wurden kompetente Bakterien für eine Transformation verwendet, die auf Grundlage von käuflichen DH5 α kompetenten *E. coli* (NEB® 5-alpha Competent *E. coli*) hergestellt wurden. Zuerst wurden diese zum Vereinzeln auf antibiotikafreien LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde aus einer Einzelkolonie eine Vorkultur in 10 ml flüssigem LB-Medium angeimpft, die eine weitere Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert wurde. Am Folgetag wurden 5-10 ml dieser Vorkultur genutzt, um 250 ml LB-Medium anzuimpfen, das bei 37 °C so lange auf dem Schüttler inkubiert wurde, bis eine optische Dichte von OD₆₀₀ 0,3-0,6 erreicht wurde (exponentielle Wachstumsphase). Nach dem Abzentrifugieren bei 5000 U/min für 10 Minuten auf 4 °C wurden die Bakterien in 25 ml gekühltem TSB-Puffer resuspendiert (LB-Medium, das mit 10% PEG 3000, 5% (V/V) DMSO und 20 mM Mg²⁺ (MgCl₂ oder MgSO₄) versetzt wurde) und in Eppendorf-Gefäße aliquotiert. Diese wurden 1-2 Stunden auf Eis inkubiert, dann in flüssigem Stickstoff zügig eingefroren und bei -80 °C bis zur Transformation gelagert.

3.2.8 | Transformation in *E. coli* Bakterien*Transformation in chemisch kompetente E. coli (KCM-Methode)*

Für die Transformation von Plasmiden in selbst hergestellte chemisch kompetente *E. coli* (siehe 3.2.7) wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert und durch Hoch- und Herunterpipettieren vermischt:

80 µl	Steriles Reinstwasser
0,2 – 2 µl	DNA (Retransformation 0,2 µl; Gibson Assembly 2 µl)
20 µl	KCM-Puffer 5x
100 µl	<i>E. coli</i> (chemisch kompetent)
	20 min auf Eis inkubieren
+ 1 ml	LB-Medium
	30-60 min bei 37 °C im Thermomixer schütteln (600U/min)
20 µl - alles	ausplattieren

Tabelle 27 | Rezeptur: Transformation chem. kompetenter *E. coli* mit KCM-Puffer

Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis und anschließender 10-minütiger Inkubation auf Raumtemperatur wurde 1 ml LB-Medium hinzugegeben und der ganze Ansatz für 30-60 Minuten bei 37 °C im Thermomixer auf 600 U/min geschüttelt. In dieser Zeit konnten sich die Bakterien vermehren und ihre Resistenz ausbilden, die sie anschließend auf der mit Selektionsantibiotika versetzten Agar-Platte benötigten. Zum Ausplattieren einer Retransformation (Vervielfältigung eines bestehenden reinen DNA-Plasmids) wurden 20 µl dieses Ansatzes mit Hilfe eines durch Ethanol und Abfackeln sterilisierten Drigalskispatels auf einer Ampicillin-haltigen LB-Agar-Platte (Ampicillin nur für pcDNA3-Vektoren) ausplattiert. Für andere Klonierungen wurde das Eppendorfgefäß erst für 20 Sekunden bei 13.300 U/min abzentrifugiert, das LB-Medium des Überstands ausgekippt, das Bakterien-Pellet in der restlichen noch vorhandenen Flüssigkeit resuspendiert und alles zusammen auf Selektionsantibiotika enthaltenden Agar-Platten ausplattiert. Anschließend wurden die Platten über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Transformation in superkompetente E. coli (Hitzeschock-Methode)

Für anspruchsvolle Klonierungen (z.B. eine Mutagenese) wurden superkompetente *E. coli* verwendet (NEB® 5-alpha Competent *E. coli*), die durch einen Hitzeschock Plasmid-DNA aufnehmen konnten. Dazu wurden 2 µl DNA eines Mutageneseansatzes oder 0,5 µl DNA eines Gibson-Assembly-Ansatzes mit 12,5 µl (1/4 des *E. coli* Gefäßes) der auf Eis aufgetauten Bakterien versetzt, durch Ansnipsen vermischt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 30 Sekunden bei 42 °C im Thermomixer erhitzt und danach weitere 5 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 250 µl des mit den Bakterien mitgelieferten SOC-Mediums (oder LB-Medium) hinzugegeben und alles zusammen für 30-60 Minuten bei 37 °C im Thermomixer inkubiert. Schließlich wurde der komplette Ansatz direkt auf Agar-Platten mit dem entsprechenden Selektionsantibiotikum ausplattiert und ebenfalls für eine Nacht bei 37 °C inkubiert.

0,5 – 2 µl	DNA (Gibson Assembly 0,5 µl; Mutagenese 2 µl)
12,5 µl	<i>E. coli</i> (superkompetente)
	30 min auf Eis inkubieren
	30 sek Hitzeschock bei 42 °C
	5 min auf Eis inkubieren
+ 250 µl	SOC-Medium
	30-60 min bei 37 °C im Thermomixer schütteln (600 U/min)
alles	ausplattieren

Tabelle 28 | Rezeptur: Transformation superkompetenter *E. coli* mit Hitzeschock

Am nächsten Morgen war die Agar-Platte idealerweise mit Einzelkolonien bewachsen, wie exemplarisch in Abb. 25 gezeigt ist.



Abb. 25 | Inkubierte Agar-Platte

3.2.9 | DNA-Präparationen

Zur Amplifikation von Bakterienkolonien bzw. der darin enthaltenen Plasmid-DNA wurde jeweils eine einzelne transformierte Bakterienkolonie in flüssigem LB-Medium (100 ml für eine „Midi-Prep“, 5 ml für eine „Mini-Prep“) unter Zugabe eines Selektionsantibiotikums angeimpft und über Nacht bei 37 °C auf dem Schüttler vermehrt. Am nächsten Tag konnte die Plasmid-DNA dann aus der stark vermehrten Bakterienmasse isoliert und nach dem Prinzip der alkalischen Lyse isoliert und aufgereinigt werden.

Midi-Prep

Für die Aufreinigung von mittleren DNA-Mengen wurde eine Midi-Prep mit Hilfe des Qiagen Plasmid Midi Kits und den dazugehörigen Puffern durchgeführt. Dazu wurde die flüssige Bakterienmischung für 10 min bei 4500 U/min in der auf 4 °C vorgekühlten Zentrifuge (Heraeus Megafuge 16R) abzentrifugiert und das Pellet in 4 ml Puffer P1 resuspendiert. Die darin enthaltene RNase A stellte sicher, dass die DNA nachfolgend nicht mit RNA verunreinigt wurde. Im Anschluss wurden 4 ml Puffer P2 hinzugefügt, der durch sein enthaltenes Natriumdodecylsulfat (SDS) und Natriumhydroxid (NaOH) die Zellmembranen lysierte und für die Denaturierung von chromosomaler DNA und der Plasmid-DNA durch Zerstörung der Wasserstoffbrücken in alkalischer Umgebung sorgte. Nach 4-minütiger Inkubationszeit wurden 4 ml Puffer P3 hinzugegeben, der die Lösung durch Kaliumacetat neutralisierte, sodass die Plasmid-DNA renaturieren konnte. Die chromosomale DNA präzipitierte aufgrund ihrer Länge zusammen mit schwerlöslichem Kaliumdodecylsulfat, Proteinen und weiteren Zelltrümmern, die als feste Bestandteile für 30 Minuten bei 5000 U/min abzentrifugiert werden konnten. Die renaturierte Plasmid-DNA im Überstand konnte durch Anionenaustauschersäulen, die vorher mit Puffer-QBT equilibriert wurden, weiter aufgereinigt werden. Nachdem die negativ geladene DNA in der Säule hängen blieb, wurde sie zweimal mit 10 ml Puffer-QC gewaschen und danach mit 5 ml Elutionspuffer eluiert. Zum Auffangen der DNA wurden 3,5 ml Isopropanol in ein kleines Zentrifugierröhrchen vorgelegt, in das die DNA reintroffen und ausfallen konnte. Im Folgenden wurde die DNA 30 Minuten bei 5000 U/min abzentrifugiert und in 2 ml unvergälltem Ethanol (70%) gewaschen, um Salze zu entfernen. Nach erneuter 10-minütiger Zentrifugation und darauffolgendem Absaugen des Überstands wurde die DNA getrocknet, bis das restliche Ethanol verdunstet war und anschließend in 100 µl sterilem Reinstwasser gelöst. Der DNA-Gehalt wurde schließlich am Nanophotometer durch erneute Wasserzugabe auf etwa 1 µg/µl eingestellt (siehe 3.2.10) und das Plasmid bei -20 °C eingefroren.

Mini-Prep

Um Plasmid-DNA in Bakterienkolonien mit Hilfe eines Kontrollverdaus zu screenen, wurde eine Mini-Prep anstatt einer Midi-Prep durchgeführt, da keine große Plasmid-DNA-Ausbeute benötigt wurde. Auch wenn die isolierte DNA durch Verunreinigungen aufgrund der fehlenden Säulenaufreinigung nicht direkt sequenziert oder in Zellen transfiziert werden konnte, war die Reinheit für einen Verdau ausreichend. Da die Mini-Prep günstiger und schneller ist, konnte eine Vielzahl verschiedener Klone auf einmal getestet werden. Bei erfolgreicher Testung eines Klon wurde mit diesem eine Midi-Prep angeimpft, um am nächsten Tag ein reines Plasmid in ausreichender Menge zu erhalten.

Für die Mini-Prep wurden nur 5 ml Selektionsmedium mit einer Bakterienkolonie angeimpft, die bei 37 °C über Nacht schüttelnd kultiviert wurde. Am nächsten Tag wurde davon 1 ml in ein Eppendorf-Gefäß überführt und die DNA-Präparation analog zur Midi-Prep in kleinem Maßstab durchgeführt. Die Bakterien wurden dieses Mal bei 13.300 U/min für 10 Minuten bei 4 °C abzentrifugiert (Heraeus Fresco 17), das Bakterienpellet in Lösung 1 (siehe *Tabelle 29*) resuspendiert und 2 µl RNase A-Lsg hinzugefügt. Nach 1- bis 2-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 200 µl der Lösung 2 hinzugegeben und gut gemischt. Nach erneuter Inkubation wurden 150 µl Lösung 3 hinzupipettiert, alles gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Nach 10-minütiger Zentrifugation konnte der Überstand, der die renaturierten DNA-Plasmide enthielt, in neue Eppendorfgefäße mit 450 µl vorgelegtem Isopropanol überführt werden, wo die DNA gefällt wurde. Nach 5-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur und anschließender 10-minütiger Zentrifugation wurde das DNA-Pellet noch einmal mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen, erneut zentrifugiert, getrocknet bis das Ethanol verdunstet war und in 30 µl Reinstwasser gelöst. Um zu testen, ob die gewünschte Plasmid-DNA, die eine veränderte Restriktionsschnittstelle enthalten muss, in einem Bakterienklon vorhanden war, wurde mit einem Teil der isolierten Plasmid-DNA ein Kontrollverdau durchgeführt. Auf einem Agarose-Gel konnten dann verschiedene Fragmentgrößen detektiert werden, um positive von negativen Klonen zu unterscheiden. Falls kein Kontrollverdau durchgeführt werden konnte, weil keine geeignete Schnittstelle vorhanden war, wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe kleiner Säulen des Gel-Extraktions-Kits aufgereinigt, damit sie anschließend sequenziert werden konnte.

Lösung 1	Lösung 2	Lösung 3	RNase A-Lösung
50 mM Glukose	0,2 M NaOH	29,44 g Kaliumacetat	10 mg/ml RNase A
10 mM EDTA	1% SDS	11,5 ml Essigsäure (96%)	
25 mM Tris-Base	in H ₂ O	ad 100 ml H ₂ O	
in H ₂ O			
pH 8,0 einstellen			
sterilisieren			

Tabelle 29 | Rezeptur: Lösungen für DNA-Präparationen

3.2.10 | Einstellung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Extinktion bei 260 nm mit Hilfe des Nano-Photometers gegen Reinstwasser gemessen. Dazu wurden 3 µl der Probe auf die Küvette pipettiert, sodass das Gerät die Konzentration nach der Absorptionsmessung direkt ausrechnen konnte. Zur Prüfung der Reinheit wurde die Absorption zusätzlich bei 230 nm, 280 nm und 320 nm gemessen. Der Quotient A₂₆₀/A₂₈₀ zeigte die Reinheit einer DNA-Präparation gegenüber Proteinen an und sollte nach einer Midi-Prep zwischen 1,8 und 2,0 liegen (RNA liefert eher höhere Werte, Proteine deutlich tiefere). Der Quotient A₂₆₀/A₂₃₀ sollte größer als zwei sein, da sonst eine Kontamination durch Zucker, Salze, organische Verbindungen oder auch Proteine wahrscheinlich gewesen wäre. Darüber hinaus sollte die Probe keine Absorption bei 320 nm zeigen, da dies durch eine Trübung, Luftblasen oder Schmutz in der Probe hervorgerufen worden wäre. Bei ausreichender Reinheit wurden alle Plasmide durch weitere Zugabe von Reinstwasser auf 1 µg/µl eingestellt.

3.2.11 | DNA-Sequenzierung

Zur abschließenden Erfolgskontrolle von Klonierungen wurden alle DNA-Plasmide nach der DNA-Präparation sequenziert. Dazu wurde 1 µg DNA mit 14 µl Reinstwasser gemischt und an Eurofins Genomics verschickt, die die DNA-Sequenz per Sanger-Methode bestimmen konnten. Um die DNA etwa 1000 bp lang von vorne zu lesen, wurde die Sequenzierung entweder mit dem CMVfw- oder dem pcDNA3fw-Primer gestartet, wohingegen die Sequenzierung von hinten mit dem pcDNA3rv-Primer oder dem pEGFPN1rv-Primer, falls ein Fluorophor angehängt war, durchgeführt wurde.

3.3 | Klonierstrategien

Für die Generierung von neuen Plasmiden wurden in dieser Arbeit verschiedene Strategien angewandt, die alle auf den unter 3.2 | *Molekularbiologische Methoden* genannten Methoden basieren.

3.3.1 | Punktmutationen

Für Punktmutationen wurden Mutagenese-PCRs analog zu dem unter 3.2.1 | *PCR* beschriebenen 50 µl Ansatz durchgeführt. Die Mutagenese-PCR wurde jedoch nur mit einem einzigen Mutagenese-Primer durchgeführt, während der rv-Primer durch Wasser ersetzt wurde. Um eine gewünschte Punktmutation einzubauen, wurde der Mutagenese-Primer so konstruiert, dass er Fehlpaarungen mit den Basen der zu mutierenden Aminosäure enthielt, die für die einzufügende Aminosäure codierten. Davor und dahinter wurden jeweils 15 komplementäre Basen angehängt, die an das *Template* binden konnten. Die Annealingtemperatur der PCR wurde auf 56 °C gesenkt, um die Fehlpaarungen des Mutageneseprimers zu kompensieren. Folgendes Beispiel zeigt den Mutagenese-Primer anhand der M₃R K485R Punktmutation:

Mutagenese-Primer:	GG ATG TCC CTG GTC A GG GAG AAG AAA GCG GC
Ausschnitt der Template-Sequenz:	GG ATG TCC CTG GTC A A GAG AAG AAA GCG GC

Um das *Template*, welches nicht auf einem Agarose-Gel von der gleichgroßen Ziel-DNA abgetrennt werden konnte, für den weiteren Klonierprozess zu entfernen, wurde das PCR-Produkt per Gel-Extraktionssäule aufgereinigt und mit DpnI für 2 h verdaut (17 µl DNA + 2 µl Cut smart Puffer + 1 µl DpnI). DpnI schneidet *dam*-methylierte DNA-Sequenzen, die vielfach in jeder von Bakterien kopierten DNA vorkommen, jedoch nicht durch eine PCR generiert werden. Dadurch wurde das *Template* in Stückchen geschnitten, während das PCR-Produkt erhalten blieb. Dieses konnte dann in superkompetente *E. coli* transformiert, vermehrt und in einer Midi-Prep aufgereinigt werden, bevor es schlussendlich sequenziert wurde. Der Klonierprozess ist in *Tabelle 30* zusammengefasst.

Mutagenese-PCR	Aufreinigung	DpnI-Verdau	Transformation	Midi-Prep	Sequenzierung
----------------	--------------	-------------	----------------	-----------	---------------

Tabelle 30 | Prozedur: Punktmutationen

3.3.2 | Subklonierung

Um einfache DNA-Veränderungen, wie z.B. einen Fluorophortausch, vorzunehmen, wurde eine Subklonierung durchgeführt. Dazu wurde ein Plasmid, das als *Backbone* diente, z.B. GRK2-YFP, mit Hilfe zweier Restriktionsenzyme vor und hinter dem YFP geschnitten (siehe 3.2.2) und der *Backbone* mit der GRK2 auf einem Agarose-Gel isoliert und aufgereinigt (siehe 3.2.3, 3.2.4). Als *Insert* wurde das Plasmid M₃R-mCit genommen, in dem das mCitrine herausgeschnitten und auf einem Agarose-Gel abgetrennt und extrahiert wurde. Falls die Schnittstellen beider DNA-Fragmente verschieden gewesen wären, hätte eine *Insert-PCR*, mit dem unter 3.2.1 | PCR beschriebenen 25 µl Ansatz, durchgeführt werden müssen. Die Primer wären dafür an den Enden so konstruiert worden, dass sie die neuen Schnittstellen enthielten, inklusive einer Sequenz von mindestens fünf Adenosinen, damit das Restriktionsenzym danach effizient hätte schneiden können. Im Folgenden ist ein Beispiel für einen mCitrine fw-Primer gezeigt, der ab dem komplementären Startcodon eine Schmelztemperatur von 60 °C aufwies, um mit 65 °C Annealingtemperatur in der PCR verwendet werden zu können.

AAAAAAGCTTATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG

Poly A, neue HindIII Schnittstelle, Startcodon des mCitrines

Nach der PCR hätte man das PCR-Produkt auf einem Agarose-Gel vom *Template* abgetrennt, aus dem Gel-extrahiert und dann mit denselben Restriktionsenzymen verdaut wie den *Backbone*. Um die Restriktionsenzyme anschließend zu entfernen, wäre hier noch die Aufreinigung mittels einer kleinen Säule aus dem Gel-Extraktions-Kit nötig gewesen. *Backbone* und *Insert* konnten dann zusammen ligiert und anschließend in chemisch kompetente *E. coli* transformiert werden. Eine Zusammenfassung des Prozesses ist in *Tabelle 31* dargestellt.

<i>Backbone</i> schneiden	Agarose-Gel: <i>Backb.</i> : große Bande <i>Insert</i> : kleine Bande		Gel-Extraktion		Ligation	Trans- forma- tion	Midi- Prep	Sequen- zierung
<i>Insert</i> schneiden								
<i>Insert</i> -PCR	Agarose- Gel	Gel- Extraktion	<i>Insert</i> schneiden	Aufreini- gung				

Tabelle 31 | Prozedur: Subklonierung

3.3.3 | Gibson-Assembly

Um chimäre Proteine zu klonieren, wurde in dieser Arbeit die Gibson-Assembly-Methode angewandt, die es erlaubte, größere DNA-Stücke ohne das Einfügen von Restriktionsschnittstellen nahtlos miteinander zu verbinden (Gibson et al., 2009). Dafür wurde das NEBuilder HiFi DNA Assembly-Kit verwendet, das ein Gemisch aus verschiedenen Enzymen enthält. Eine 5'-Exonuklease hat die Aufgabe, einzelsträngige DNA-Überhänge zu erzeugen, indem das 5'-Ende anverdaut wird, wodurch *Sticky-ends* entstehen. Haben zwei oder auch mehrere DNA-Fragmente eine überlappende DNA-Sequenz, können sich die überstehenden komplementären Enden dadurch aneinanderlagern. Anschließend füllt eine DNA-Polymerase die Lücken auf, während die Ligase am Schluss den letzten Spalt verschließt. Das allgemeine Prinzip des Gibson-Assemblies ist in Abb. 26 schematisch dargestellt.

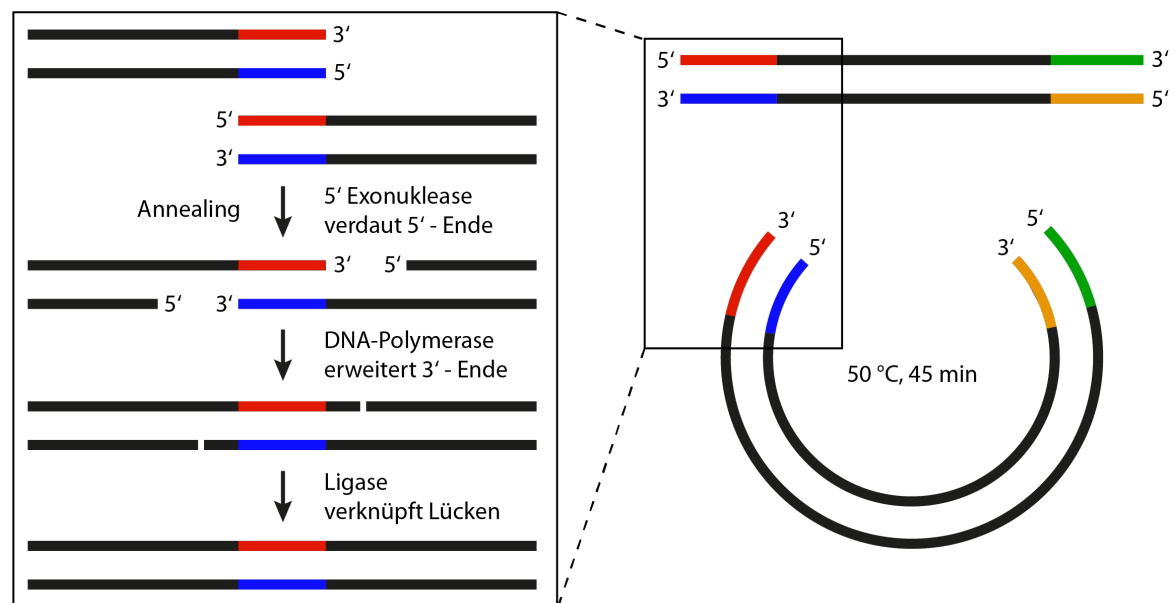


Abb. 26 | Prinzip eines Gibson-Assemblies

Um die wichtigste Voraussetzung der überlappenden DNA-Enden sicherzustellen, wurden für einen Gibson-Assembly typischerweise zwei getrennte PCRs nach den unter 3.2.1 | PCR beschriebenen PCR-Protokollen durchgeführt, einmal um den Vektor zu öffnen (50 µl Ansatz) und um ein Fragment mit zusätzlichen Vektor-komplementären DNA-Enden zu amplifizieren (25 µl Ansatz).

Primerdesign

Die schwierigste Aufgabe eines Gibson-Assemblys ist das Primerdesign, das in *Abb. 27* schematisch anhand der Klonierung eines chimären Proteins gezeigt ist. Alle Primer wurden mit dem Plasmid-editor SnapGene Viewer so konstruiert, dass die komplementären Basen eine Schmelztemperatur von 60 °C aufwiesen, damit die PCR bei 65 °C Annealingtemperatur durchgeführt werden konnte. Die Fragment-Primer enthielten außerdem einen mit dem Vektor um 20 bp überlappenden Überhang (rot, orange).

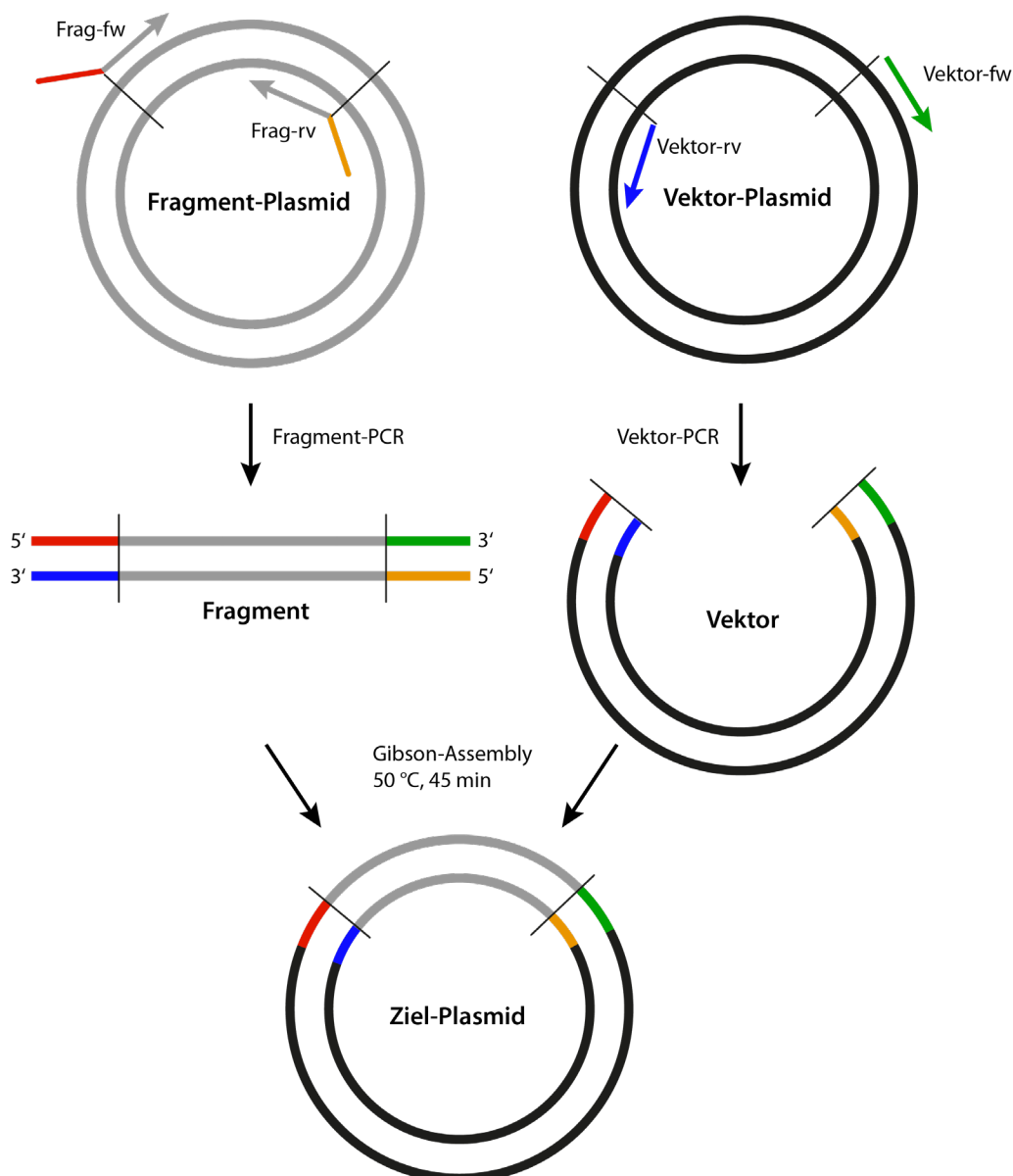


Abb. 27 | Primerdesign eines typischen Gibson-Assemblys

Für den Fall, dass die auszutauschende Sequenz kleiner als 100 bp war, wurde der Gibson-Assembly so modifiziert, dass nur eine Vektor-PCR durchgeführt wurde, wie in Abb. 28 gezeigt ist. In diesem Fall war die einzufügende Sequenz (grau) jeweils zur Hälfte in den Primerüberhängen codiert, zuzüglich einer Überlappung um weitere 20 bp (rot / blau).

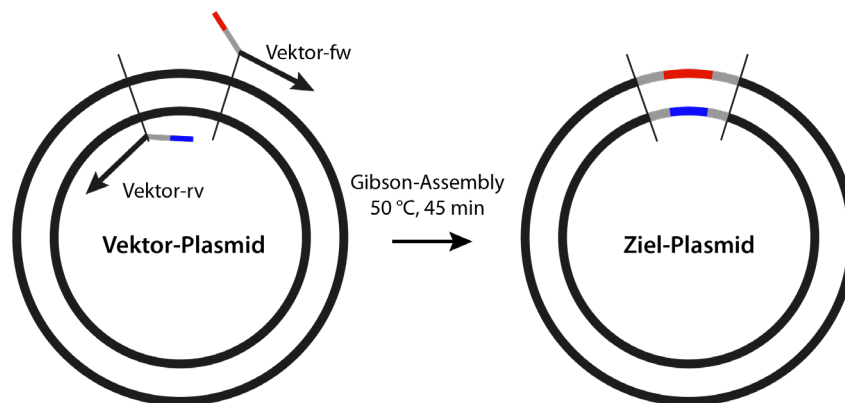


Abb. 28 | Primerdesign eines Gibson-Assemblies für kurze DNA-Modifikationen

Nach den PCRs wurde das Fragment auf einem Agarose-Gel vom *Template* abgetrennt und aus dem Gel extrahiert. Das PCR-Produkt des Vektors wurde dagegen direkt per Gel-Extraktionssäule aufgereinigt und mit DpnI für 2 h verdaut, da es für die Erstellung der Konstrukte in dieser Arbeit selten kleiner als das *Template* war und daher nicht auf einem Agarose-Gel-abgetrennt werden konnte. Anschließend wurde das DpnI für 20 min bei 80 °C inaktiviert.

Für einen Gibson-Assembly wurde nach der Gehaltsbestimmung der DNA-Stücke folgender Ansatz pipettiert (Tabelle 32), wobei Fragmente < 200 bp im 5-fachen Überschuss, sonst im 2- bis 3-fachen Überschuss, zugegeben wurden. Falls der Gehalt des Vektors sehr niedrig war (< 25 ng/µl), wurden von ihm nur 50 ng verwendet, damit nicht zu viele Verunreinigungen in den Ansatz gekommen wären. Nach 45-minütiger Inkubation bei 50 °C im Thermomixer konnte der Ansatz in chemisch kompetente Zelle transformiert werden (siehe 3.2.8.) und nach der DNA-Präparation eines Klons sequenziert werden.

2-5 x Überschuss	Fragment (20 ng bei 200 bp ~ 0,15 pmol)
50 - 100 ng	Vektor (100 ng bei 5000 bp ~ 0,03 pmol)
10 µl	NEB Hifi DNA Assembly Mastermix 2x
ad 20 µl	H ₂ O

Tabelle 32 | Rezeptur: Gibson-Assembly

3.4 | FRET-Experimente

3.4.1 | FRET – Förster-Resonanz-Energie-Transfer

Alle Experimente in dieser Arbeit wurden mit Fluoreszenz-basierten Methoden auf der Grundlage von FRET (Förster-Resonanz-Energie-Transfer) durchgeführt. FRET wurde als Erstes 1946 von Theodor Förster beschrieben und bezeichnet das Ereignis, bei dem ein angeregtes Donorfluorophor seine Anregungsenergie strahlungslos an ein benachbartes Akzeptorfluorophor überträgt, das dann seinerseits fluoresziert (Förster, 1946). Da die Effizienz der Energieübertragung extrem vom Abstand der beiden Fluorophore zueinander abhängt, lassen sich durch FRET-Messungen sehr kleine Abstandsänderungen (1 – 10 nm) in Echtzeit messen. Im Gegensatz zu biochemischen Assays können mit spektroskopischen Methoden auch lebende Zellen untersucht werden, sodass Protein-Protein-Interaktionen mit Hilfe von FRET in Echtzeit untersucht werden können.

FRET-Voraussetzungen

Damit die Anregungsenergie eines Fluorophors strahlungslos auf ein anderes Fluorophor übertragen werden kann, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Das wichtigste Kriterium, damit FRET auftreten kann, ist der Abstand der Fluorophore zueinander, der weniger als 10 nm betragen muss. Dies lässt sich anhand folgender Formel nachvollziehen, in der die Effizienz der Energieübertragung (E) von der sechsten Potenz des Fluorophor-Abstands (r) und des Förster-Radius (R_0) abhängt. Der Förster-Radius bezeichnet den Abstand zweier Fluorophore, bei dem die Energieübertragung via FRET genau 50% beträgt und ist charakteristisch für ein bestimmtes Fluorophor-Pärchen. Der zugehörige Graph der Funktion ist für einen typischen Förster-Radius von 5 nm in Abb. 29 dargestellt.

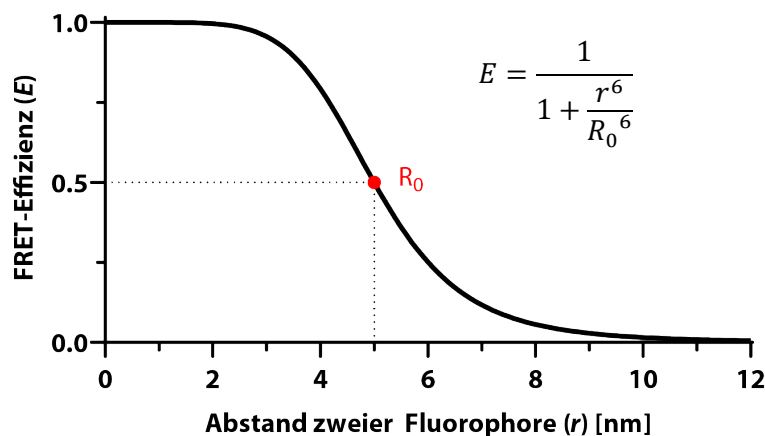


Abb. 29 | FRET-Effizienz

Der Einfluss der FRET-Effizienz ist in Abhängigkeit des Abstands der Fluorophore bei einem typischen Förster-Radius von 5 nm dargestellt.

Der Förster-Radius ist wiederum von Faktoren wie der Quantenausbeute des Donorfluorophors ohne Energieübertragung (Q_0), dem Dipol-Orientierungsfaktor κ , dem Brechungsindex des Mediums (n) und dem Integral (J) der überlappenden Spektren von Donor und Akzeptor abhängig, was die folgende Formel verdeutlicht.

$$R_0^6 = 8,8 * 10^{-28} * \frac{\kappa^2 * Q_0 * J}{n^4}$$

Der Orientierungsfaktor κ^2 lässt sich in Experimenten nicht kontrollieren, da er vom Winkel zwischen dem Emissionsdipol des Donors und dem Absorptionsdipol des Akzeptors abhängig ist und aufgrund von flexiblen Strukturen variieren kann. Daher muss ein FRET-Assay immer erst experimentell getestet und ein Fluorophor ggf. an einer anderen Stelle positioniert werden. κ^2 kann Werte zwischen 0 und 4 annehmen, wobei $\kappa^2 = 0$ bedeutet, dass kein FRET möglich ist, während $\kappa^2 = 4$ die beste Energieübertragung ermöglicht, wie in Abb. 30 dargestellt ist.

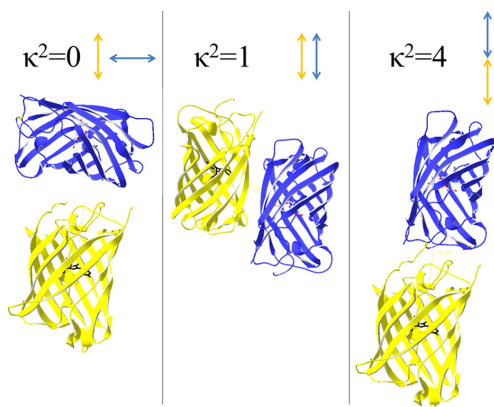


Abb. 30 | Orientierung von Donor- und Akzeptorfluorophoren (Müller et al., 2013)

Die dritte wichtige Voraussetzung für FRET ist die deutliche Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Absorptionsspektrum des Akzeptors, die sich durch die Auswahl entsprechend geeigneter Fluorophore erfüllen lässt (siehe Abb. 31).

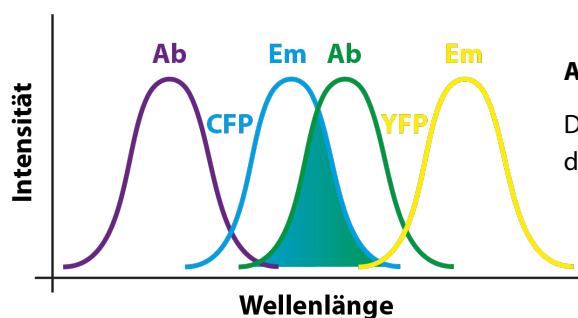


Abb. 31 | Spektrale Überlappung

Die Überlappung der Donoremission vom CFP mit der Akzeptorabsorption vom YFP ist farbig hinterlegt.

3.4.2 | Fluorophore

Fluoreszierende Proteine wurden in Form des GFPs (*green fluorescent protein*) erstmals 1962 in der Qualle *Aequorea victoria* entdeckt (Prasher et al., 1992) und bilden heutzutage eine wichtige Grundlage für die Fluoreszenzmikroskopie. Sie ermöglichen beispielsweise die direkte Beobachtung der räumlichen und zeitlichen Verteilung von Proteinen in lebenden Zellen, da sie an Proteine fusioniert in Zellen exprimiert werden können.

In dieser Arbeit wurden modifizierte Varianten des GFPs verwendet, die cyan (CFP) und gelb (YFP) fluoreszierten. Dieses Fluorophor-Pärchen erfüllt die Voraussetzung der spektralen Überlappung als FRET-Donor und FRET-Akzeptor (Abb. 32) und wurde in Form der am weitesten entwickelten Untervarianten des CFPs (mTurquoise2) und des YFPs (mCitrine) verwendet. Diese boten eine sehr gute Helligkeit, bei gleichermaßen hoher Bleichstabilität und wurden an GPCRs, Untereinheiten des heterotrimeren G-Proteins oder an andere Effektoren, wie z.B. GRK2, angehängt.

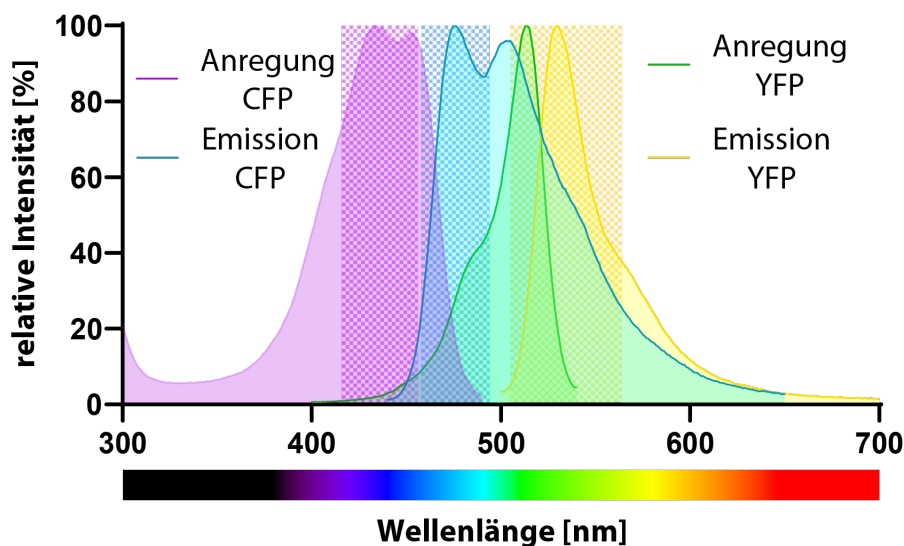


Abb. 32 | Fluorophor-Spektren

Die Daten der Fluorophor-Spektren wurden von <https://www.chroma.com/spectra-viewer> exportiert. Die Filter des in dieser Arbeit verwendeten Mikroskops wurden anhand der Wellenlängen eingezeichnet. Die Anregung des CFPs wurde durch den Anregungsfilter (violett schraffiert) und die Emissionen durch den Emissionsfilter des CFPs (blau schraffiert) und des YFPs (gelb schraffiert) begrenzt. Die Wellenlängen der Filter wurden außerdem so weit beschnitten, wie ein dichroischer Strahlenteiler im Vorhinein das Spektrum begrenzte.

Falschanregung und Durchbluten

Wie in Abb. 33 (links) dargestellt, wurde die Anregung bei 420 – 450 nm hauptsächlich auf die CFP-Variante beschränkt. Das YFP wurde jedoch im Ausläufer seines Anregungsspektrums in geringen Teilen mitangeregt, was im Folgenden als „Falschanregung“ bezeichnet wird. Da die Emissionsspektren beider Fluorophore außerdem stark überlappen (Abb. 33, rechts), konnten sie nicht vollständig getrennt voneinander detektiert werden, sodass etwa 40% des cyan-farbenen Lichts fälschlicherweise im Gelbkanal detektiert wurden, was im Folgenden als „Durchbluten“ in den Gelbkanal bezeichnet wird.

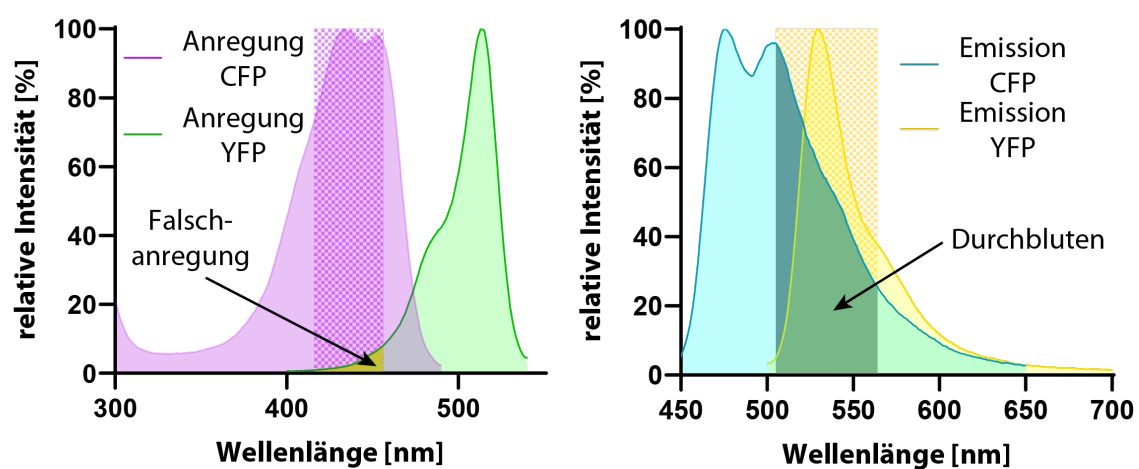


Abb. 33 | Falschanregung und Durchbluten in den YFP-Kanal

Der Anregungsfilter (violett schraffiert) überlappt mit dem Absorptionsspektrum des YFPs und führt zur Falschanregung (links). Die CFP-Emission überlappt mit dem YFP-Emissionsfilter (gelb schraffiert) und führt zum Durchbluten in den Gelbkanal (rechts).

Beide „Fehler“ sorgen für eine zu hell detektierte YFP-Emission. Um diese zu korrigieren, wurde durch die alleinige Transfektion eines CFP-markierten Proteins zuerst der prozentuale Anteil der CFP-Intensität bestimmt, der fälschlicherweise im YFP-Kanal erkannt wird („Durchblutungsfaktor“ = $\frac{F_{YFP}}{F_{CFP}} \approx 40\%$). Zusätzlich wurde mit einem ausschließlich YFP-markierten Protein die prozentuale Falschanregung bei 420-450 nm im Verhältnis zur Direktanregung des gesamten YFPs bei 500 nm bestimmt („Falschanregungsfaktor“ = $\frac{F_{YFP \text{ angeregt bei } 420-450 \text{ nm}}}{\text{direkt } F_{YFP \text{ angeregt bei } 500 \text{ nm}}}$). Somit konnten für jede Zelle das Durchbluten und die Falschanregung von der fälschlicherweise zu hell detektierten YFP-Emission nach folgender Formel subtrahiert werden:

$$\text{korrigierte YFP} = F_{YFP} - \text{Durchblutungsfaktor} * F_{CFP} - \text{Falschanregungsfaktor} * \text{direkt } F_{YFP}$$

3.4.3 | Fluoreszenzmikroskopie-Setup

FRET-Messungen wurden bei Raumtemperatur an einem invertierten Mikroskop (Axiovert 100; Zeiss) durchgeführt, das mit einem 60-fach Ölimmersionsobjektiv (PlanApo N 60x/1.45 Oil; Nikon) ausgestattet war. Zwei LED-Lichtquellen (pE-100; CoolLED) wurden mit Intensitäten von 4% bei 440 nm und 10% bei 500 nm verwendet und die Fluoreszenz wurde mit einer *high-performance* CCD-Kamera (Spot Pursuit von Spot Imaging / Diagnostic Instruments) detektiert. Der Aufbau des Mikroskops, inklusive Filter und Strahlenteiler (dichroische Spiegel), ist in Abb. 34 dargestellt. Zum Messen kam der Filterblock mit dem Strahlenteiler 458 LP zum Einsatz, während für das Selektieren von Zellen und die Direktanregung des YFPs der Filterblock mit den Dualband-Filtern verwendet wurde. Die Emissionen wurden simultan nebeneinander auf einem schwarzweiß-Kamerasensor aufgenommen.

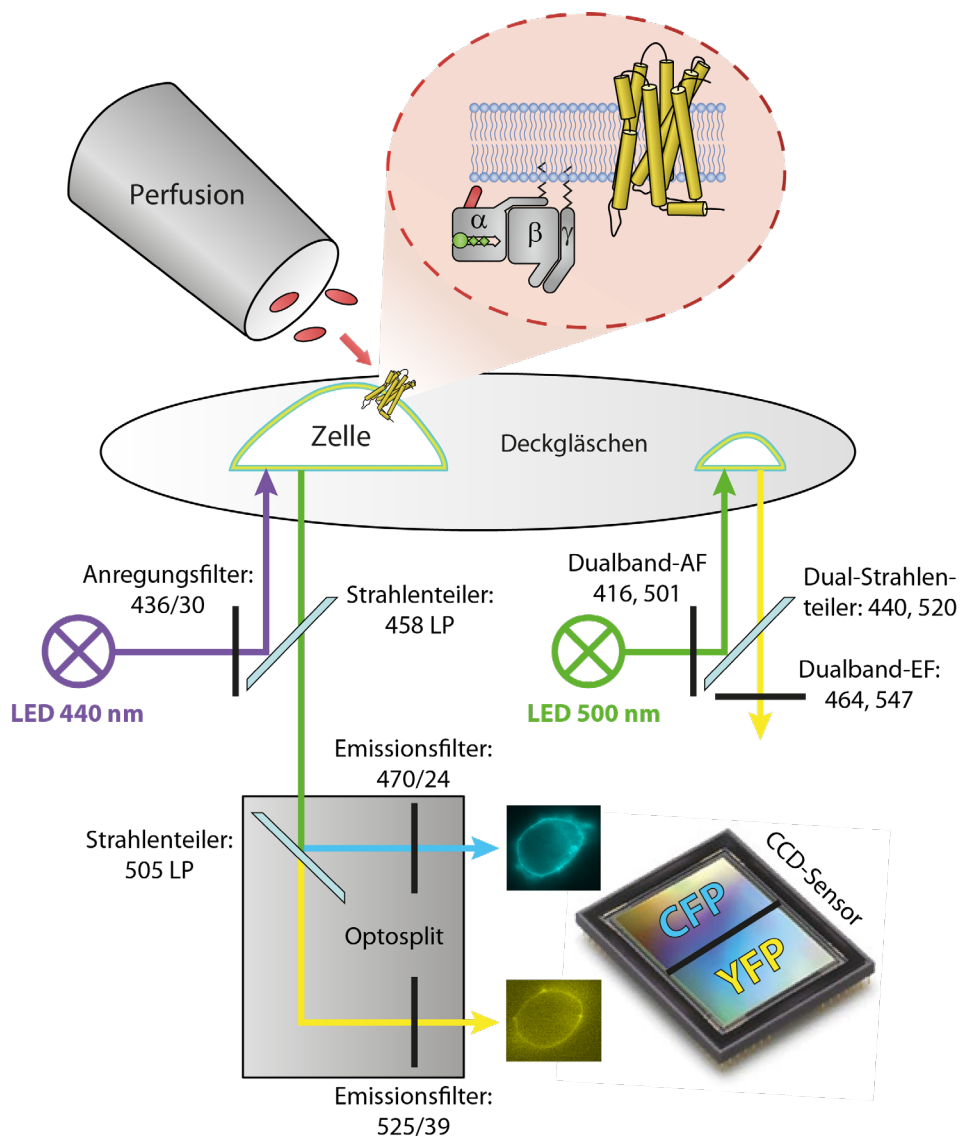
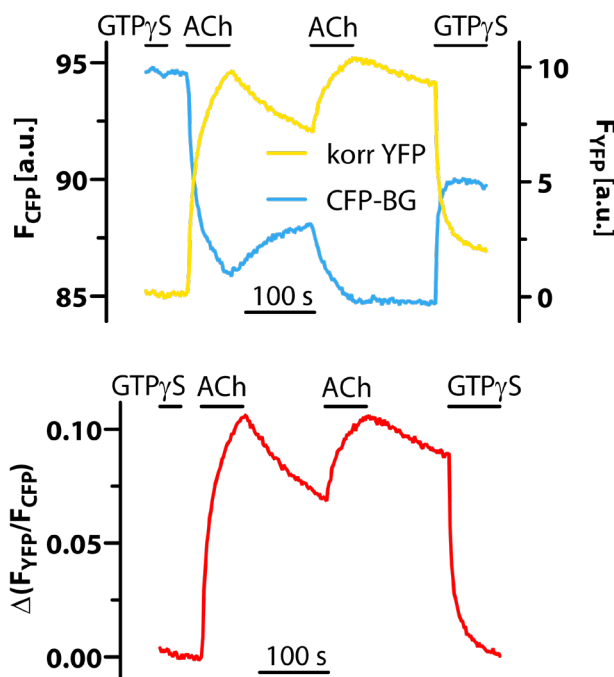


Abb. 34 | Aufbau des Fluoreszenz-Mikroskops

3.4.4 | Allgemeine experimentelle Durchführung

48 h vor dem Mikroskopieren wurden HEK293T-Zellen transfiziert und 24 h vorher auf Deckgläschen in 6-Well-Platten gesplittet (siehe 3.1.1). Während der Experimente wurden diese in eine Attofluor-Messkammer, die gleichzeitig als Flüssigkeitsreservoir diente, eingespannt und einmal mit externem Puffer (Zusammensetzung, siehe 2.8) gewaschen, um verbliebenes Nährmedium zu entfernen. Während der Messung wurden die Zellen mit 60 ms langen Lichtpulsen bei einer Frequenz von 0,5 Hz beleuchtet, während sie durch ein Perfusionssystem (VC3-8xP Series; ALA Scientific Instruments) dauerhaft mit Puffer oder den durch Striche über den Graphen angegebenen Lösungen umspült wurden. Die CFP-Fluoreszenz (F_{CFP}) wurde nach Export der Messdaten aus VisiView (Visitron Systems) in Excel ermittelt, indem die Leuchtdichte eines Background-ROIs (*Region of Interest*) von der des Zell-ROIs subtrahiert wurde (CFP-BG), um die Hintergrundfluoreszenz zu korrigieren. Die YFP-Fluoreszenz wurde ebenso bestimmt, zuzüglich der Korrektur für das Durchbluten und die Falschanregung (korr YFP), wie unter 3.4.2 beschrieben. Typische FRET-Kurven, in denen die CFP-Intensität durch Energieübertragung auf das YFP dunkler und die YFP-Intensität gegenläufig heller wurde, sind in Abb. 35 / Abb. 36 dargestellt.

**Abb. 35 | Einzelfluoreszenz-Emissionen**

Emissionen von YFP und CFP sind während einer FRET-Messung gezeigt, in der Gq an den M₃R in permeabilisierten Zellen bindet. Die YFP-Emission wurde für die Hintergrundfluoreszenz, das Durchbluten des CFPs in den YFP-Kanal und die Falschanregung des YFPs bei 420 – 450 nm korrigiert (korr-YFP). Die CFP-Emission wurde für die Hintergrundfluoreszenz korrigiert (CFP-BG).

Abb. 36 | Repräsentative FRET-Kurve

Das resultierende Verhältnis von $F_{\text{YFP}} / F_{\text{CFP}}$ aus der Messung in Abb. 35 ist als FRET-Antwort dargestellt. Das Fotobleichen wurde korrigiert, indem die Baseline exponentiell subtrahiert wurde.

Da die fluoreszierenden Proteine während der Messung durch Fotobleichen unterschiedlich verblassten, wurde der resultierende Drift aller FRET-Kurven in dieser Arbeit durch eine exponentielle Baselinesubtraktion mit OriginPro 2018 korrigiert, sodass erst die finale FRET-Antwort, bezeichnet als $\Delta(F_{\text{YFP}}/F_{\text{CFP}})$, gezeichnet wurde.

3.5 | G-Protein-Bindungsassay in permeabilisierten Zellen

3.5.1 | Transfektion des G-Protein-Bindungsassays

Um die Bindung des heterotrimeren G-Proteins an einen Rezeptor mit FRET zu untersuchen, wurden die Zellen nach folgendem Protokoll transfiziert (Tabelle 33).

Menge [µg]	Plasmid
0,5 µg 0,8 µg	M ₃ R- mCit / M ₃ R-Mutante- mCit oder H ₁ R- mCit
1,5 µg	Gαq / Gαo / Gα-Chimären
0,5 µg	Gβ ₁
0,2 µg	mTurq2 -Gγ ₂
0,3 µg	pcDNA3 (nur bei M ₃ R)

Tabelle 33 | Transfektionsprotokoll für den G-Protein-Bindungsassay

Es wurden pro Bedingung jeweils ein GPCR, eine Gα-, eine Gβ- und eine Gγ-UE transfiziert. Um gleiche DNA-Mengen für die Transfektion des Assays mit verschiedenen Rezeptoren sicherzustellen, wurde beim M₃R noch ein leerer Vektor (pcDNA3) co-transfiziert, um die geringere DNA-Menge des besser exprimierenden M₃Rs auszugleichen.

3.5.2 | Permeabilisierung von Zellen

Für die Messung der Bindungsstabilität des G-Proteins am Rezeptor war es außerdem wichtig Nukleotid-freie Bedingungen in der Zelle herzustellen, da die Interaktion zwischen Rezeptor und G-Protein ansonsten zu kurzlebig wäre, um sie zuverlässig messen zu können. Wie in einer vorherigen Studie beschrieben (Ilyaskina et al., 2018), wurden daher Stabilitäten von GPCR-G-Protein Komplexen in permeabilisierten Zellen gemessen. Dafür wurden die Zellen durch eine 2,5-minütige Inkubation in einer 0,075% Saponinlösung permeabilisiert und anschließend fünfmal mit internem Puffer, der intrazelluläre Elektrolytverhältnisse nachahmt (siehe 2.8), gewaschen, um die Nukleotide herauszuspülen und GTP-freie Bedingungen herzustellen.

3.5.3 | Messung des G-Protein-Bindungsassays

Unter dem Mikroskop wurden Einzelzellen mit membranständigen CFP- / YFP-Expressionen selektiert, die zudem eine rundliche Form, als Indikator der vollständigen Permeabilisierung, aufwiesen. Diese wurden während der Messung kontinuierlich mit internem Puffer oder den durch Striche über den Graphen angegebenen Lösungen perfundiert. Durch die Stimulation mit einem Agonisten (Acetylcholin bei M_3R , Histamin bei H_1R) bildete sich ein mittels FRET in Echtzeit detektierbarer stabiler GPCR-G-Protein-Komplex, da die nachfolgende G-Protein-Aktivierung durch das fehlende GTP verhindert wurde. Der ternäre Komplex konnte jedoch wieder dissoziieren, wenn der Agonist ausgewaschen (langsam) oder das G-Protein durch die Applikation von GTP γ S (Hydrolyse-stabile Variante von GTP) aktiviert wurde und vom Rezeptor dissoziierte (schnell). Schematisch ist der Assay in Abb. 37 dargestellt.

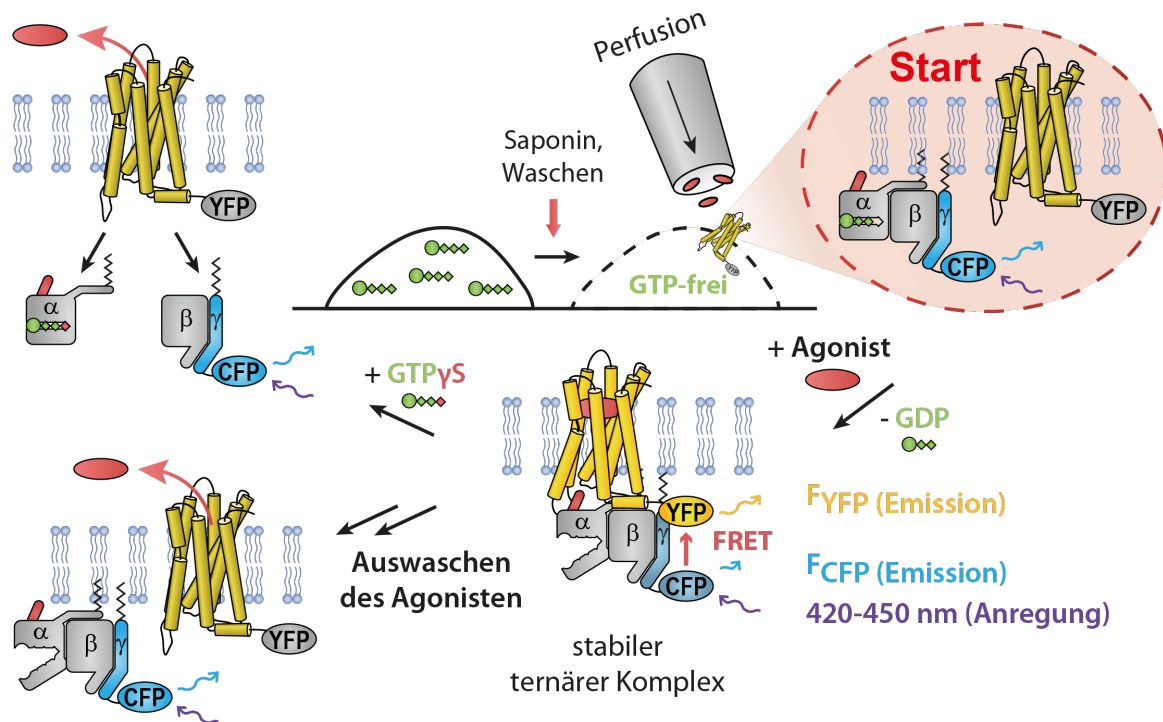


Abb. 37 | G-Protein-Bindungsassay in permeabilisierten Zellen

Permeabilisierte Zellen wurden bei 420 – 450 nm angeregt, während das YFP/CFP Emissionsverhältnis simultan aufgenommen wurde, um FRET zwischen dem N-terminal mTurquoise2-markierten Gy und dem C-terminal mCitrine-markierten Rezeptor zu messen.

3.5.4 | Quantifizierung der Bindungsstabilität von G-Proteinen durch Dissoziationskinetiken

Als Maß für die G-Protein-Bindungsstärke an GPCRs wurden die Stabilitäten von GPCR-G-Protein-Komplexen unter Nukleotid-freien Bedingungen quantifiziert, indem nach Beendigung der Agoniststimulation die Dissoziationskinetiken des Komplexes während des Auswaschens analysiert wurden. Um das Zeitprotokoll zu verdeutlichen, mit dem alle in dieser Arbeit durchgeführten Bindungsassays durchgeführt wurden, sind in *Abb. 38* gemittelte FRET-Kurven von Gq- und Go-Proteinen gezeigt, die unter GTP-freien Bedingungen mit dem M₃R unterschiedlich stark interagierten. Da während der Messung potentiell verbliebene Nukleotide kontinuierlich durch die Perfusion aus der Zelle gespült wurden, wurde erst die zweite Agonist-Auswaschphase quantifiziert (*Abb. 38*, rechts), damit eine vollständige Nukleotid-Depletion sichergestellt war. Für die Auswertung wurde der zweite Peak aller Kurven auf 1 normalisiert, sodass danach die Fläche unter den Kurven (AUC = *Area under the curve*) ausgerechnet werden konnte, die die Analyse von verschiedenartigen Kinetiken (z.B. lineare und exponentielle Verläufe) gleichermaßen ermöglichte. Die AUC wurde durch die trapezoidale Methode in Excel nach folgender Formel berechnet:

$$AUC = t * \left(\frac{Y_1}{2} + \sum_{i=2}^{letzt-1} Y_i + \frac{Y_{letzt}}{2} \right)$$

t = Zeitintervall zwischen den Messpunkten (hier 2 sek)
Y = $\Delta(F_{YFP}/F_{CFP})$ normalisiert

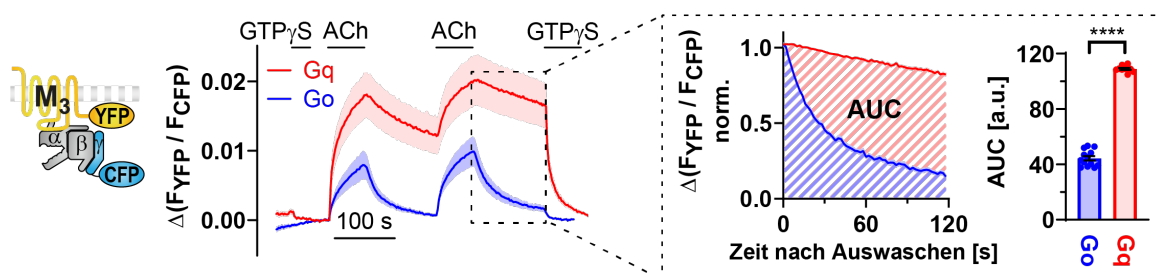


Abb. 38 | FRET-Kurven des G-Protein-Bindungsassays

Nach kurzer Applikation von GTP γ S wurden die Zellen zweimal mit 10 μ M ACh (oder 100 μ M Histamin) für jeweils 1 min gefolgt von einer 2-minütigen Auswaschphase stimuliert, bis eine abschließende Gabe von GTP γ S zur vollständigen G-Protein-Dissoziation vom Rezeptor führte. Die Baselines aller Kurven wurden auf Basis des GTP γ S-Levels subtrahiert und die Daten als Mittelwerte \pm SEM dargestellt. Die absoluten Amplituden von der Gq- (n=10) und Go-Bindung (n=13) an den M₃R sind im linken Graphen dargestellt. Die Dissoziationskinetiken während des Auswaschens wurden durch die Berechnung der AUC von auf den 2. Peak normalisierten Kurven quantifiziert, wie in der Vergrößerung rechts gezeigt ist.

3.6 | Indirekter G-Protein-Aktivierungssassay (GRK2-Rekrutierung durch Gβγ)

3.6.1 | Transfektion: GRK2-Rekrutierung durch Gβγ

Um die nach der Bindung folgende Aktivierung des heterotrimeren G-Proteins zu untersuchen, wurden die Zellen nach folgendem Protokoll transfiziert (Tabelle 34).

Menge [μg]	Plasmid
0,5 μg	M ₃ R-WT oder H ₁ R-WT
1,5 μg	Gαq / Gαo / Gα-Chimären pcDNA3 (Neg.-Kontrolle)
0,5 μg	Gβ ₁
0,2 μg	mTurquoise2-Gγ ₂
0,3 μg	GRK2-mCit

Tabelle 34 | Transfektionsprotokoll für die GRK2-Rekrutierung durch Gβγ

Es wurden pro Bedingung jeweils ein GPCR, eine Gα-, eine Gβ- und eine Gγ-UE zuzüglich der GRK2 transfiziert, um FRET zwischen dem N-terminal mTurquoise2-markierten Gγ₂ und der C-terminal mCitrine-markierten GRK2 zu messen.

3.6.2 | Indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung

Die G-Protein-Aktivierung wurde in intakten Zellen indirekt untersucht, indem die GRK2-Rekrutierung durch freie Gβγ-Untereinheiten gemessen wurde, die nur von aktivierten Gα-UE dissoziieren konnten (siehe Abb. 39).

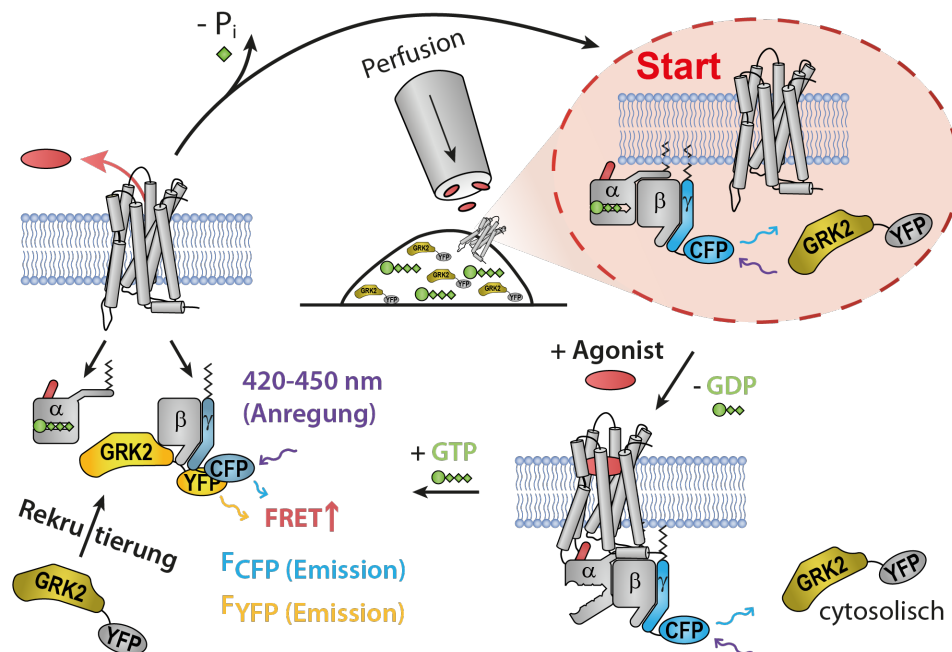


Abb. 39 | Indirekter G-Protein-Aktivierungssassay (GRK2-Rekrutierung durch Gβγ)

Intakte Zellen wurden bei 420-450 nm angeregt, während das YFP/CFP Emissionsverhältnis simultan aufgezeichnet wurde, um FRET zwischen dem N-terminal mTurquoise2-markierten Gγ₂ und der C-terminal mCitrine-markierten GRK2 zu messen.

Für diesen FRET-Assay wurde unter dem Mikroskop eine Gruppe von Zellen mit membranständiger CFP- und heller cytosolischer YFP-Expression ausgewählt, die robuste Durchschnittswerte über mehrere Zellen lieferten. Um die Effizienz der G-Protein-Aktivierung zu quantifizieren, wurden Agonisten (Carbachol für M_3R , Histamin für H_1R) in aufsteigenden Konzentrationen so lange appliziert, bis das FRET-Signal jeweils einen Gleichgewichtszustand erreichte (siehe Abb. 40).

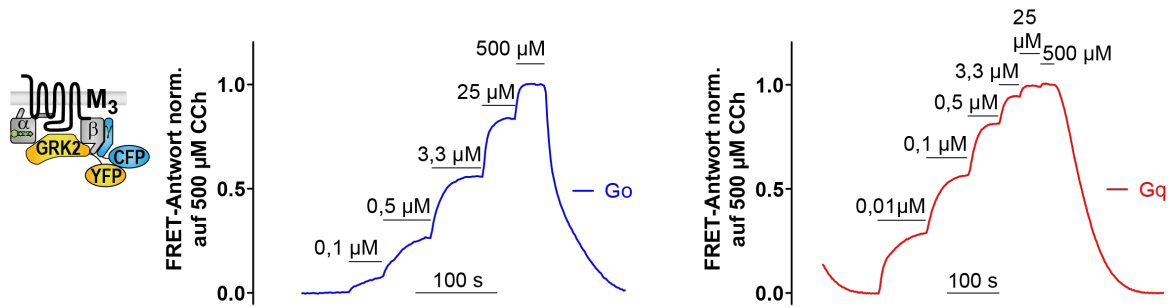


Abb. 40 | Repräsentative Kurven der indirekten G-Protein-Aktivierung

Repräsentative Zellen zeigen die indirekte Messung der G_o - und G_q -Aktivierung durch den M_3R nach Stimulation mit steigenden Agonist-Konzentrationen. Die Baselines aller Kurven wurden auf Basis der Minima vor der ersten Agonist-Applikation und nach dem finalen Auswaschen subtrahiert und die FRET-Antwort wurde für jede Zelle auf die sättigende Maximalkonzentration auf 1 normalisiert.

3.6.3 | Konzentrations-Wirkungskurven der G_q -Aktivierung

Für jede Konzentration wurde die FRET-Antwort im Verhältnis zur normalisierten Maximalantwort bestimmt und daraus eine Konzentrations-Wirkungskurve mit variabler Steigung mit Graph-Pad Prism gefittet, bei der das Minimum auf 0 und das Maximum auf 1 fixiert wurde (Abb. 41). Dadurch konnte die Rekrutierung der GRK2 durch die $G\beta\gamma$ -UE mittels FRET konzentrationsabhängig dargestellt werden.

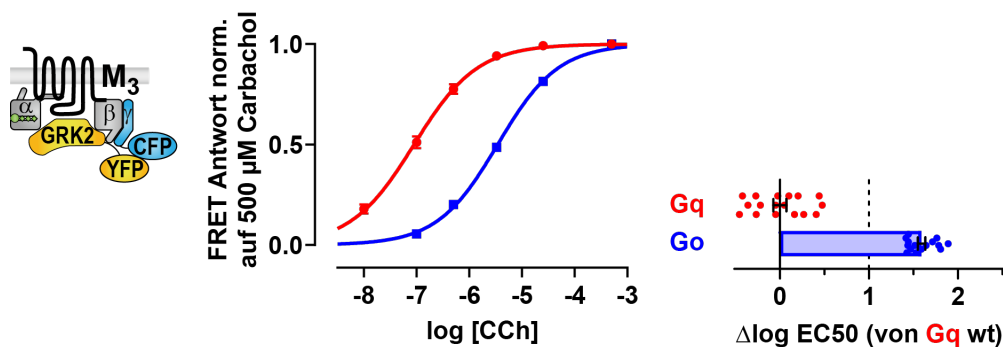


Abb. 41 | Repräsentative Konzentrations-Wirkungskurven der G-Protein-Aktivierung

Konzentrations-Wirkungskurven mit variabler Steigung (Minimum auf 0 und Maximum auf 1 fixiert) sind stellvertretend für die G-Protein-Aktivierung von G_q ($n=12$) und G_o ($n=17$) dargestellt. Alle Datenpunkte wurden als Mittelwerte \pm SEM gezeichnet. Die Fehlerbalken sind teilweise nicht sichtbar, wenn sie kleiner waren als die Größe des Symbols. Individuell (für jede Zelle) berechnete EC_{50} -Werte wurden in horizontalen Balkendiagrammen in Relation zu gemittelten EC_{50} -Werten eines G_q -Wildtyps dargestellt.

3.6.4 | Aktivierung von endogenen G-Proteinen

Um die spezifische Aktivierung transfizierter G α -UE von endogen exprimierten G α -UE zu unterscheiden, wurde für jede G α -UE zusätzlich getestet, ob die absoluten Amplituden bei maximaler Agonist-Konzentration (500 μ M CCh oder Histamin) signifikant größer waren, als von leerem Vektor (pcDNA3), der als negative Kontrolle anstatt einer G α -UE transfiziert wurde (Abb. 42). Nur wenn dies der Fall war, wurden die Daten weiter ausgewertet.

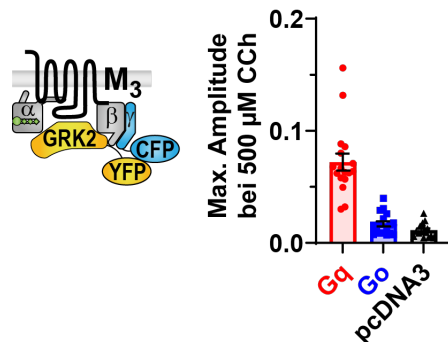


Abb. 42 | Maximale Amplituden der Gq- / Go-Aktivierung gegenüber endogenen G-Proteinen

Repräsentative Zellen zeigen die absoluten Amplituden der indirekten G-Protein-Aktivierung bei maximaler Agonist-Konzentration (500 μ M) von Gq (n=12) und Go (n=17) gegenüber pcDNA3 (n=16) (leerer Vektor, der anstatt einer G α -UE transfiziert wurde) als Mittelwerte \pm SEM.

3.7 | Direkter G-Protein-Aktivierungsassay

3.7.1 | Transfektion: Direkter G-Protein-Aktivierungsassay

Um die G-Protein-Aktivierung direkt zu messen, wurde folgende DNA in die Zellen transfiziert (Tabelle 35).

Menge [μ g]	Plasmid
0,5 μ g	M ₃ R-WT
1,5 μ g	G α q-YFP / G α o-YFP / G α -YFP-Chimären
0,5 μ g	G β ₁
0,2 μ g	mTurq2-G γ ₂

Tabelle 35 | Transfektionsprotokoll für den direkten G-Protein-Aktivierungsassay

Es wurden pro Bedingung jeweils ein GPCR, eine G α -, eine G β - und eine G γ -UE transfiziert, um FRET zwischen dem N-terminal mTurquoise2-markierten G γ und der intern mCitrine-markierten G α -UE zu messen.

3.7.2 | Direkte Messung der G-Protein-Aktivierung

Für den direkten G-Protein-Aktivierungsassay wurde die Abnahme des initialen FRET-Signals des heterotrimeren G-Proteins bei dessen Aktivierung zwischen YFP-markierter $G\alpha$ -UE und CFP-markierter $G\gamma$ -UE gemessen (Abb. 43).

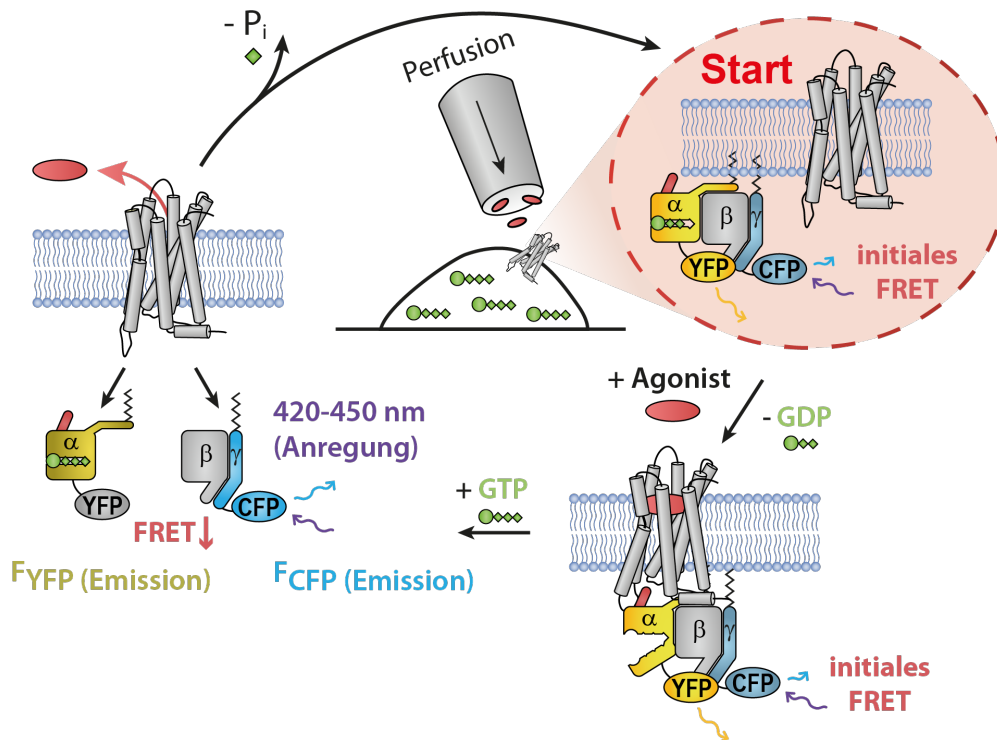


Abb. 43 | Direkter G-Protein-Aktivierungsassay in intakten Zellen

Intakte Zellen wurden bei 420-450 nm angeregt, während das YFP/CFP Emissionsverhältnis simultan aufgezeichnet wurde, um FRET zwischen dem N-terminal mTurquoise2-markierten $G\gamma$ und der intern mCitrine-markierten $G\alpha$ -UE zu messen.

Der direkte Assay wurde analog zum indirekten G-Protein-Aktivierungsassay (siehe 3.6) durchgeführt. Dafür wurde unter dem Mikroskop ebenfalls eine Gruppe von Zellen ausgewählt, jedoch mit membranständiger CFP- und YFP-Expression. Nach Stimulation mit denselben Agonist-Konzentrationen wurde das G-Protein aktiviert, sodass das initiale FRET-Signal des heterotrimeren G-Proteins konzentrationsabhängig abnahm, wenn die Untereinheiten voneinander dissoziierten (siehe Abb. 44). Anschließend wurden ebenfalls Konzentrations-Wirkungskurven (analog zu 3.6.3) bestimmt.

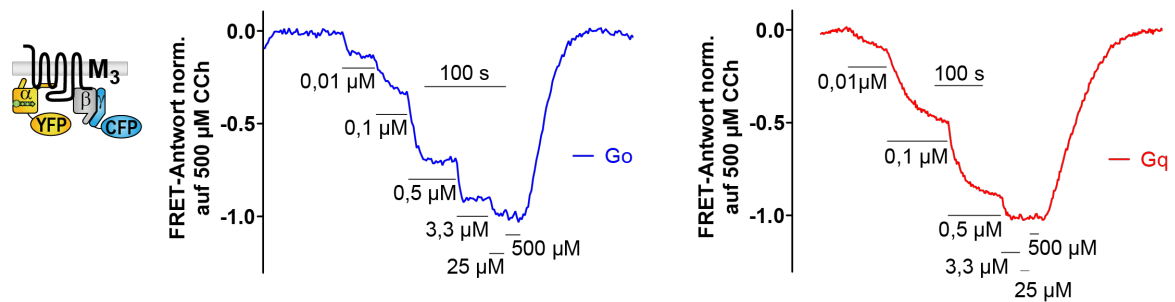


Abb. 44 | Repräsentative Kurven der direkten G-Protein-Aktivierung

Repräsentative Zellen der direkten Messung der $G\alpha$ - und Gq -Aktivierung durch den M_3R . Die FRET-Antwort wurde für jede Zelle auf die sättigende Maximalkonzentration auf -1 normalisiert.

Der Vorteil dieses direkten G-Protein-Aktivierungsassays besteht darin, dass er beim Vergleich von verschiedenen $G\alpha$ -UE keine unspezifischen FRET-Signale durch die endogene $G\alpha$ -Expression erzeugt. Der Nachteil ist jedoch, dass das YFP mitten in die $G\alpha$ -UE eingefügt ist und daher potentiell ihre Eigenschaften bzw. Konformation verändert. Dies ist besonders wichtig, wenn man Gq -YFP gegen $G\alpha$ -YFP vergleicht, da die Fluorophore dort jeweils an zwei verschiedenen Positionen eingefügt sind, sodass man die Aktivierungspotenzen nicht direkt miteinander vergleichen kann. Aus diesem Grund wurde der indirekte G-Protein-Aktivierungsassay mit den eher Wildtyp-artigen $G\alpha$ -UE in dieser Arbeit bevorzugt.

3.8 | Statistik

Alle Ergebnisse des ersten Teils über chimäre G-Proteine wurden von mindestens drei unabhängigen Messtagen (unabhängige Transfektionen) entnommen. Der zweite Teil über mutierte oder chimäre Rezeptoren beruht zum großen Teil auf präliminären Experimenten, die noch nicht ausreichend reproduziert wurden (siehe Legende für die genaue Anzahl der Experimente). Alle Daten bestehen aus n gemessenen Zellen und sind als Mittelwerte \pm SEM dargestellt.

Statistikberechnungen wurden mit GraphPad Prism 8.4 durchgeführt. Einseitige t-Tests wurden für den Vergleich von zwei Gruppen durchgeführt, wohingegen einfache ANOVAs benutzt wurden, um mehr als zwei Gruppen miteinander zu vergleichen. An die ANOVAs wurden Tukey-Posttests angeschlossen, um jede Bedingung gegen den Mittelwert jeder anderen Kondition zu testen oder Dunnett-Posttests, um jede Gruppe gegen eine Kontrollbedingung zu vergleichen. Unterschiede wurden als signifikant angesehen für $P < 0,05$.

Kapitel 4: Ergebnisse

Die Ergebnisse wurden größtenteils aus der am 28.07.2020 bei *Communications Biology* eingereichten und in Revision befindlichen Publikation entnommen:

Jelinek, V. und Bünemann, M.; *“Structures in G proteins important for subtype-selective receptor binding and subsequent activation”*, *Communications Biology*, 2020

4.1 | Einfluss von G-Protein Strukturen auf die Kopplungsspezifität

Wie zuvor von (Ilyaskina et al., 2018) gezeigt, bilden M_3 -Rezeptoren mit Gq-Proteinen im Vergleich zu Gi/o-Proteinen deutlich stabilere Komplexe, die mittels der FRET-basierten Messung der G-Protein-Bindung in permeabilisierten HEK293T-Zellen detektiert werden können (ähnlich 3.5, Abb. 38). Daraus ergab sich im ersten Teil dieser Arbeit das Ziel, Schlüsselstrukturen in der $G\alpha$ -UE zu identifizieren, die die Kopplungseigenschaften wesentlich beeinflussen. Zu diesem Zweck wurden vielfältige Gq- und Go-basierte $G\alpha$ -Chimären kloniert, indem Aminosäuren an den Kontaktstellen mit dem GPCR systematisch miteinander vertauscht wurden. FRET-Messungen ermöglichten dann die Beurteilung der Bindungsstabilität der $G\alpha$ -Chimären am Rezeptor, indem ihre Dissoziationsgeschwindigkeiten von den Gq-gekoppelten M_3 - und H_1 -Rezeptoren unter Nukleotid-freien-Bedingungen miteinander verglichen wurden (siehe 3.5 | *G-Protein-Bindungsassay in permeabilisierten Zellen*).

Darüber hinaus wurde die nachfolgende Aktivierung der $G\alpha$ -Chimären in intakten Zellen durch Auswerten von Konzentrations-Wirkungskurven analysiert, die letztlich die physiologisch relevanten Kopplungseffizienzen widerspiegeln (siehe 3.6 | *Indirekter G-Protein-Aktivierungsassay (GRK2-Rekrutierung durch $G\beta\gamma$)* und 3.7 | *Direkter G-Protein-Aktivierungsassay*).

Die Kombination von Bindungs- und Aktivierungsexperimenten ermöglichte zusammen die differenzierte Betrachtung zeitlich verschiedener Ereignisse während des mehrstufigen Kopplungsprozesses.

4.1.1 | Untersuchung des α_5 -Terminus (α_5 -Helix)

Bindung von C-terminal modifizierten α_5 -Untereinheiten an den M_3R

Da viele Studien gezeigt haben, dass der C-Terminus (α_5 -Helix) der α_5 -UE essentiell für die α_5 -Subtyp-selektive G-Protein-Aktivierung ist (Conklin et al., 1993; Kostenis, Gomeza, et al., 1997), wurde angenommen, dass er auch von großer Bedeutung für die Bindung am Rezeptor sei. Deshalb wurden in dieser Arbeit zuerst C-terminal modifizierte chimäre α_5 -UE erstellt, die es ermöglichen den Einfluss verschiedener Abschnitte der α_5 -Helix auf die Bindungsstabilität in M_3R -G-Protein-Komplexen zu untersuchen (wie in 3.5, Abb. 38).

Chimäre α_5 -Untereinheiten wurden mit dem Ziel kloniert, Gq-ähnliche Eigenschaften zu erhalten. Kleine Schemata in Abb. 45 veranschaulichen, dass in GoqC11 die letzten 11 (Hälfte der α_5 -Helix) und in GoqC22 die letzten 22 Aminosäuren (ganze α_5 -Helix) durch die entsprechenden Aminosäuren von Gq ersetzt wurden. GoqC22-11 enthält dagegen die inneren 11 Aminosäuren des C-Terminus von Gq, während die äußeren 11 AS von Gao unverändert blieben. In den FRET-Kurven in Abb. 45 sieht man, dass es während der Auswaschphase von Acetylcholin (10 μ M ACh) keinen signifikanten Unterschied zwischen der AUC von Go und GoqC11 gab, obwohl kürzlich veröffentlichte GPCR-G-Protein-Strukturen vermuten lassen, dass der äußerste C-Terminus der wichtigste Bindungspartner des Rezeptors ist (J. Wang et al., 2020). Im Gegensatz dazu dissoziierten Konstrukte, die die innere α_5 -Helix (GoqC22-11) oder die ganze α_5 -Helix von Gq (GoqC22) enthielten, langsamer vom M_3R als Go, was darauf hindeutet, dass der N-terminale Teil der α_5 -Helix deutlich mehr zur Stabilität von M_3R -G-Protein-Komplexen beiträgt als der C-terminale Teil der α_5 -Helix (Abb. 45).

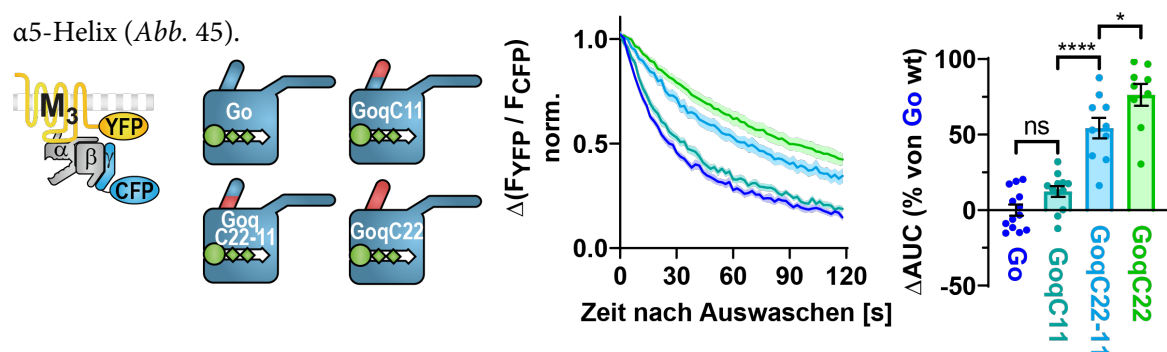


Abb. 45 | Stabilität der Bindung von GoqC-Konstrukten an den M_3R

Die Bindung der α_5 -UE an den M_3R wurde mit Hilfe von FRET zwischen dem mTurquoise2-markierten G_{α_2} und dem mCitrine-markierten M_3R gemessen, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dafür wurden permeabilisierte Zellen mit 10 μ M ACh stimuliert, während die Dissoziationskinetiken von M_3R -G-Protein-Komplexen in der darauffolgenden Auswaschphase des Agonisten durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (Δ AUC) zu Go-WT dargestellt wurden. (Go; n=13, GoqC11; n=12, GoqC22-11; n=10 und GoqC22; n=9 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, *P < 0,05, ns P \geq 0,05).

Gq-basierte Chimären wurden analog zu den GoqC-Konstrukten kloniert, bei denen in umgekehrter Weise Teile der C-terminalen Helix durch Gao ersetzt wurden. GqoC11, das die letzten 11 Aminosäuren von Gao enthält, dissoziierte nur minimal schneller vom M₃R als Gq, was in einer um weniger als 5 % reduzierten AUC resultierte (Abb. 46). Der äußerste Teil des C-Terminus hatte also auch hier kaum einen Einfluss auf die Dissoziation vom Rezeptor.

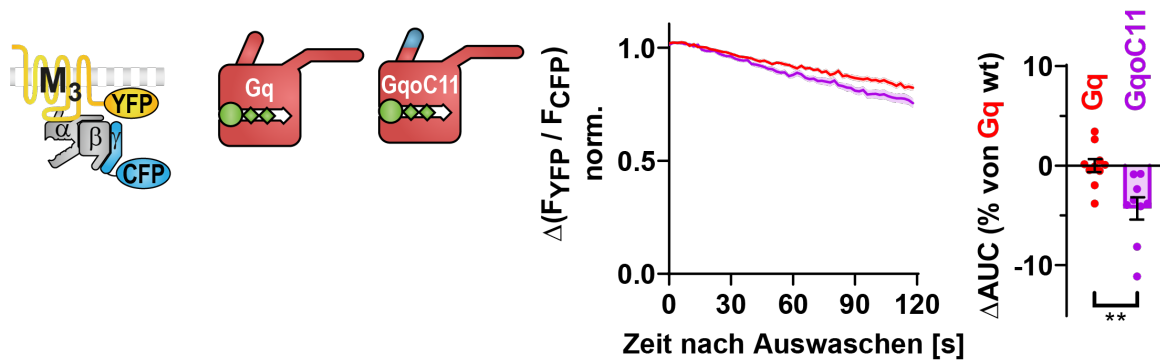


Abb. 46 | Stabilität der Bindung von GqoC11 an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Gq-WT dargestellt. (Gq; n=10 und GqoC11; n=9 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (**P < 0,01).

Der komplette Austausch der $\alpha 5$ -Helix führte dazu, dass GqoC22 vermutlich gar nicht mehr an den M₃R binden konnte (Abb. 47), da die Amplituden denen der Bindung von endogenen G-Proteinen (pcDNA3 statt transfizierter G α -UE) ähnelten. Dies bestätigt, dass der N-terminale Teil der $\alpha 5$ -Helix eine grundlegende Funktion für die Bindung an M₃-Rezeptoren ausübt.

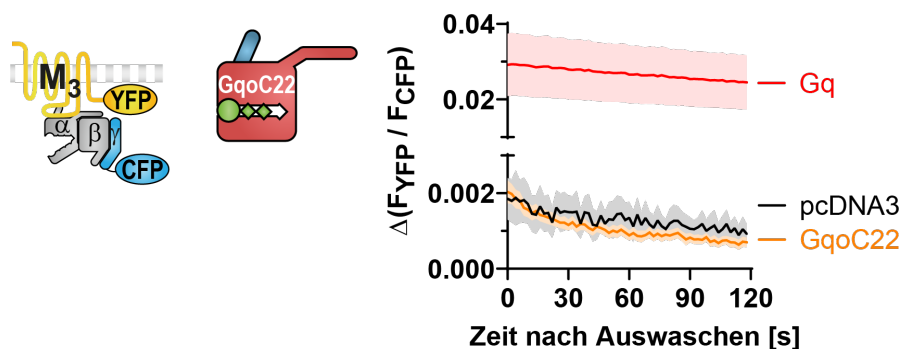


Abb. 47 | Gestörte Bindung von GqoC22 an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Absolute Amplituden zeigen, dass für GqoC22 kein FRET-Signal über endogenen G-Proteinen (leerer Vektor anstatt G α -UE transfiziert) detektiert werden konnte. (Gq; n=11, GqoC22; n=14 und pcDNA3; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen).

Aktivierung von C-terminal modifizierten $G\alpha$ -Untereinheiten durch den M_3R

Für die gleichen $G\alpha$ -Chimären sollte nun untersucht werden, wie sich die Stabilität der M_3R -G-Protein-Komplexe nachfolgend auf die physiologisch relevante G-Protein-Aktivierung auswirkt. Aus diesem Grund wurden indirekte G-Protein-Aktivierungsmessungen in intakten Zellen durchgeführt, indem die Rekrutierung von YFP-markierten GRK2 durch CFP-markierte $G\beta\gamma$ -UE gemessen wurde, nachdem diese während der Applikation von steigenden Carbachol-Konzentrationen (wie unter 3.6, Abb. 40 dargestellt) von aktivierten $G\alpha$ -UE dissoziierten.

In den Experimenten erhöhte die C-terminale $\alpha 5$ -Helix von G_{aq} in $GoqC11$ signifikant die Aktivierungspotenz im Vergleich zu Go (Abb. 48), was anhand der nach links verschobenen Kurve ersichtlich ist. Bemerkenswerterweise steht die erhöhte Aktivierungspotenz einer unverändert stabilen Bindung auf dem Niveau von Go entgegen (Abb. 45). Die am weitesten nach links verschobene Kurve gehört zu $GoqC22$ mit der vollständig ausgetauschten $\alpha 5$ -Helix, während $GoqC11$ mit der C-terminalen und $GoqC22-11$ mit der N-terminalen $\alpha 5$ -Helix von G_{aq} genau zwischen Go und $GoqC22$ lagen (Abb. 48). Dies lässt vermuten, dass die äußeren und inneren 11 Aminosäuren der $\alpha 5$ -Helix gleichermaßen zu erhöhten Aktivierungspotenzen beitragen. Spezifische Signale der chimären $G\alpha$ -UE waren sichergestellt, da alle Konstrukte signifikant höhere Amplituden bei der maximalen Carbachol-Konzentration zeigten, als Zellen, die mit leerem Vektor (pcDNA3) anstatt $G\alpha$ -UE transfiziert waren (Abb. 48).

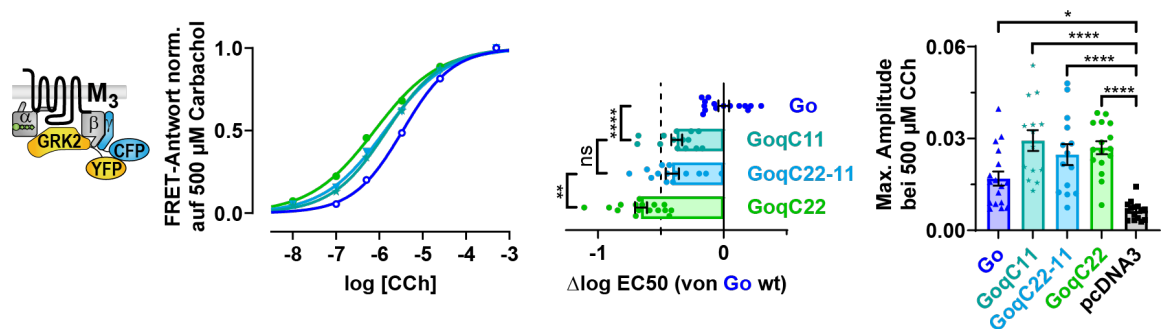


Abb. 48 | Aktivierung von $GoqC$ -Konstrukten durch den M_3R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC_{50} -Werte wurden relativ zu Go -WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go ; $n=15$, $GoqC11$; $n=14$, $GoqC22-11$; $n=14$, $GoqC22$; $n=16$ und $pcDNA3$; $n=15$ von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC_{50} -Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen $pcDNA3$) durchgeführt (**** $P < 0,0001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Um die unspezifische Aktivierung endogener G-Proteine zu unterdrücken, wurden die Zellen in folgendem Experiment mit Pertussis-Toxin (PTX), das Gi/o-Proteine inaktiviert, vorbehandelt, wie unter 3.1.4 beschrieben. Als Positivkontrolle der PTX-Wirkung wurden PTX-sensitive Go-UE (Go PTX sens.) transfiziert, deren Amplituden durch die PTX-Vorbehandlung auf pcDNA3-Level sanken. Die endogene G-Protein-Aktivierung (pcDNA3) konnte jedoch durch PTX nicht weiter reduziert werden (pcDNA3 + PTX) (siehe Abb. 49).

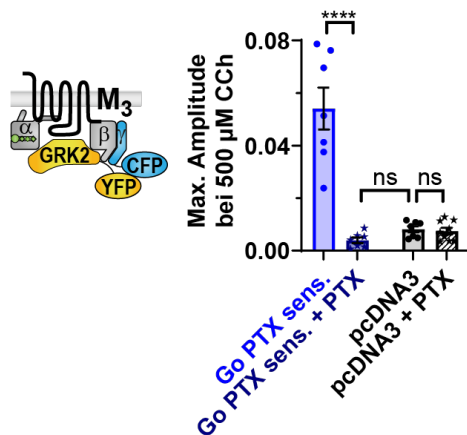


Abb. 49 | PTX-unterdrückte Aktivierung von Gi/o-Proteinen

Maximale Amplituden wurden gemessen, wie unter (3.6, Abb. 42) beschrieben. Zusätzlich wurden die Zellen mit Pertussis-Toxin (PTX) über Nacht bei einer Konzentration von 50 ng/ml vorbehandelt. (Go PTX sens.; n=7, Go PTX sens. + PTX; n=7, pcDNA3; n=7, pcDNA3 + PTX; n=9 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ns P ≥ 0,05).

Beim umgekehrten Austausch der C-terminalen $\alpha 5$ -Helix in $G\alpha_q$ durch $G\alpha_o$, zeigte GqoC11 eine fast auf das Level von Go reduzierte Aktivierungspotenz (Abb. 50), obwohl die Gq-ähnliche Bindungsstabilität am M_3R , wie zuvor beschrieben, noch erhalten blieb (Abb. 46).

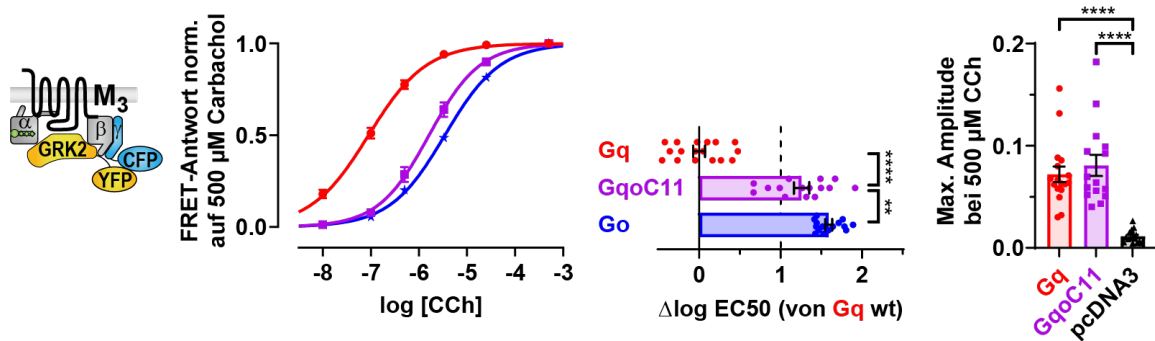


Abb. 50 | Aktivierung von GqoC-Konstrukten durch den M_3R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC50-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=17, GqoC11; n=15, Go; n=15 und pcDNA3; n=16 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC50-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, **P < 0,01).

GqoC22 reagierte dagegen mit kleinen Amplituden, die nicht größer waren als die der endogenen G-Protein-Aktivierung (pcDNA3). Das bedeutet, dass GqoC22 überhaupt nicht mehr aktiviert werden konnte (Abb. 51), was jedoch in Einklang mit der schon initial gestörten Bindung an den Rezeptor gebracht werden kann (Abb. 47).

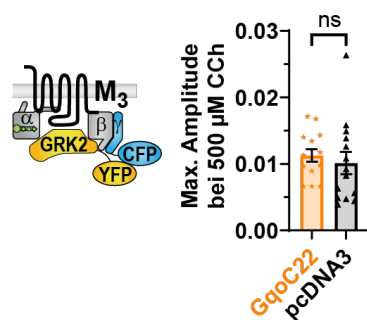


Abb. 51 | Verhinderte Aktivierung von GqoC22 mit dem M₃R

Maximale Amplituden der Gα-Aktivierung wurden gemessen, wie unter (3.6, Abb. 42) beschrieben. (GqoC22; n=14, pcDNA3; n=14 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (ns $P \geq 0,05$).

Um zu überprüfen, ob die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung verlässliche Ergebnisse lieferte, wurde sie zusätzlich direkt gemessen, indem die Abnahme des initialen FRET-Signals nach Aktivierung von YFP-markierten Gα- und CFP-markierten Gγ₂-Untereinheiten untersucht (wie unter 3.7, Abb. 44 abgebildet) und in Konzentrations-Wirkungskurven dargestellt wurde.

Die Verschiebung der Konzentrations-Wirkungskurven von GqoC11 und GqoC11, in Relation zu den jeweiligen nativen Gα-UE (Abb. 52), korrelierte in diesem Experiment sehr gut mit der indirekt gemessenen Aktivierung (Abb. 48, Abb. 50). Der Abstand zwischen den Kurven von Gq und Go war aber in den direkten Messungen (Abb. 52) kleiner als in Abb. 50. Da die Fluorophore jedoch in Go-YFP und Gq-YFP an unterschiedlichen Positionen in die Gα-UE eingefügt sind, ist der Vergleich der direkt gemessenen Aktivierungspotenzen problematisch. Deshalb schien der indirekte Aktivierungsassay mit den eher Wildtyp-artigen Gα-UE überzeugender und wurde für alle weiteren Messungen verwendet.

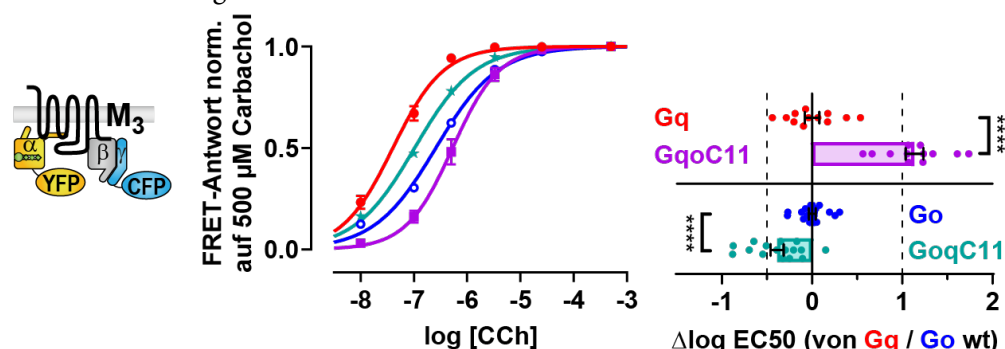


Abb. 52 | Direkte G-Protein-Aktivierungsmessung mit dem M₃R

Die direkte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.7, Abb. 44) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT bzw. Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=12, GqoC11; n=12, Go; n=17 und GqoC11; n=16 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurden zwei einseitige t-Tests durchgeführt (**** $P < 0,0001$).

4.1.2 | Untersuchung von chimären Go-Proteinen mit dem M₃R

Da die $\alpha 5$ -Helix der G α -UE, wie unter (4.1.1) beschrieben, vermutlich nur partiell zur Stabilität der Bindung am M₃R beiträgt, wurden in den folgenden Experimenten weitere G α -Strukturen untersucht, die dazu in der Lage waren, Gq-ähnliche Kopplungseigenschaften auf Go-basierte G α -Chimären zu übertragen. Wie schematisch in Abb. 53 dargestellt, wurden verschiedenen Teile von Gao durch die entsprechenden Aminosäuren von Gaq ersetzt, wozu einmal der N-Terminus inklusive des $\alpha N/\beta 1$ -Loops (GoqN), die Verbindung der $\beta 2/\beta 3$ -Faltblätter (Goq2) und der Loop zwischen der $\alpha 4$ -Helix und dem $\beta 6$ -Faltblatt (Goq4) gehören. Zusätzlich wurden die Goq-Chimären auch mit chimären Strukturen der $\alpha 5$ -Helix (siehe 4.1.1) kombiniert.

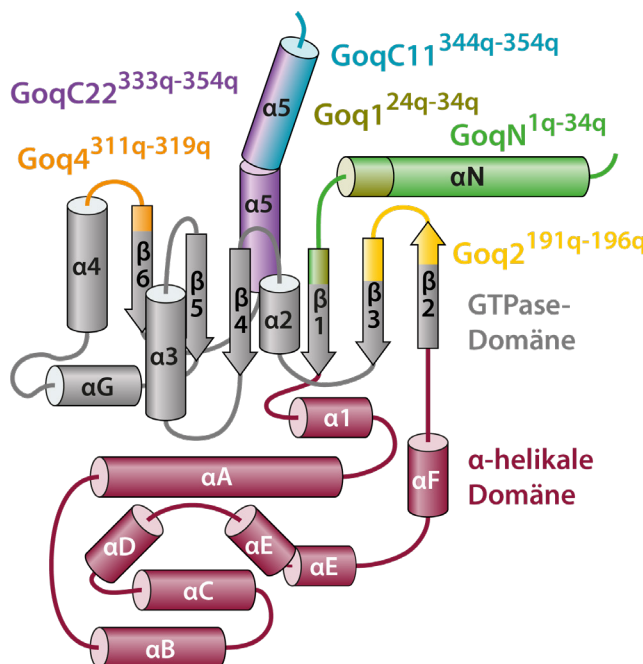


Abb. 53 | Schematische Struktur von Gao

Eingefärbte Segmente in der schematischen G-Protein-Struktur zeigen die Aminosäuren in Gao, die durch die entsprechenden AS von Gaq in chimären Goq-UE ersetzt wurden.

Die ausgetauschten Aminosäuren sind in folgendem Snake-Plot genauer dargestellt (Abb. 54).

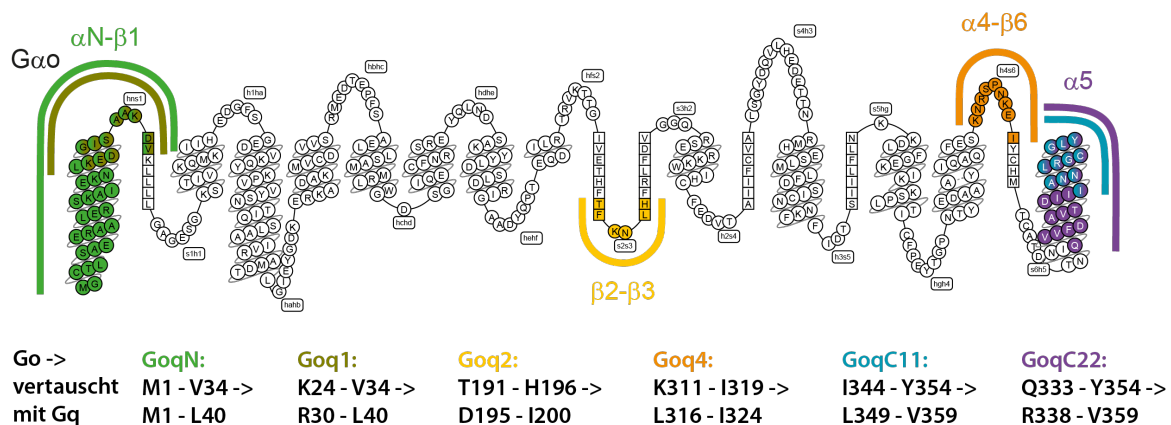


Abb. 54 | Snake-Plot von Gao

Der Snake-Plot wurde der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen und entsprechend eingefärbt.

Um die Lokalisation der chimären Strukturen besser zu veranschaulichen, wurden die ausgetauschten Aminosäuren in der dreidimensionalen Oberfläche der $G\alpha$ -UE farblich markiert, wofür die mit dem M_3R nah verwandte Struktur des M_1R -G11-Komplexes (pdb: 6oij, Maeda et al., 2019) genutzt wurde (Abb. 55).

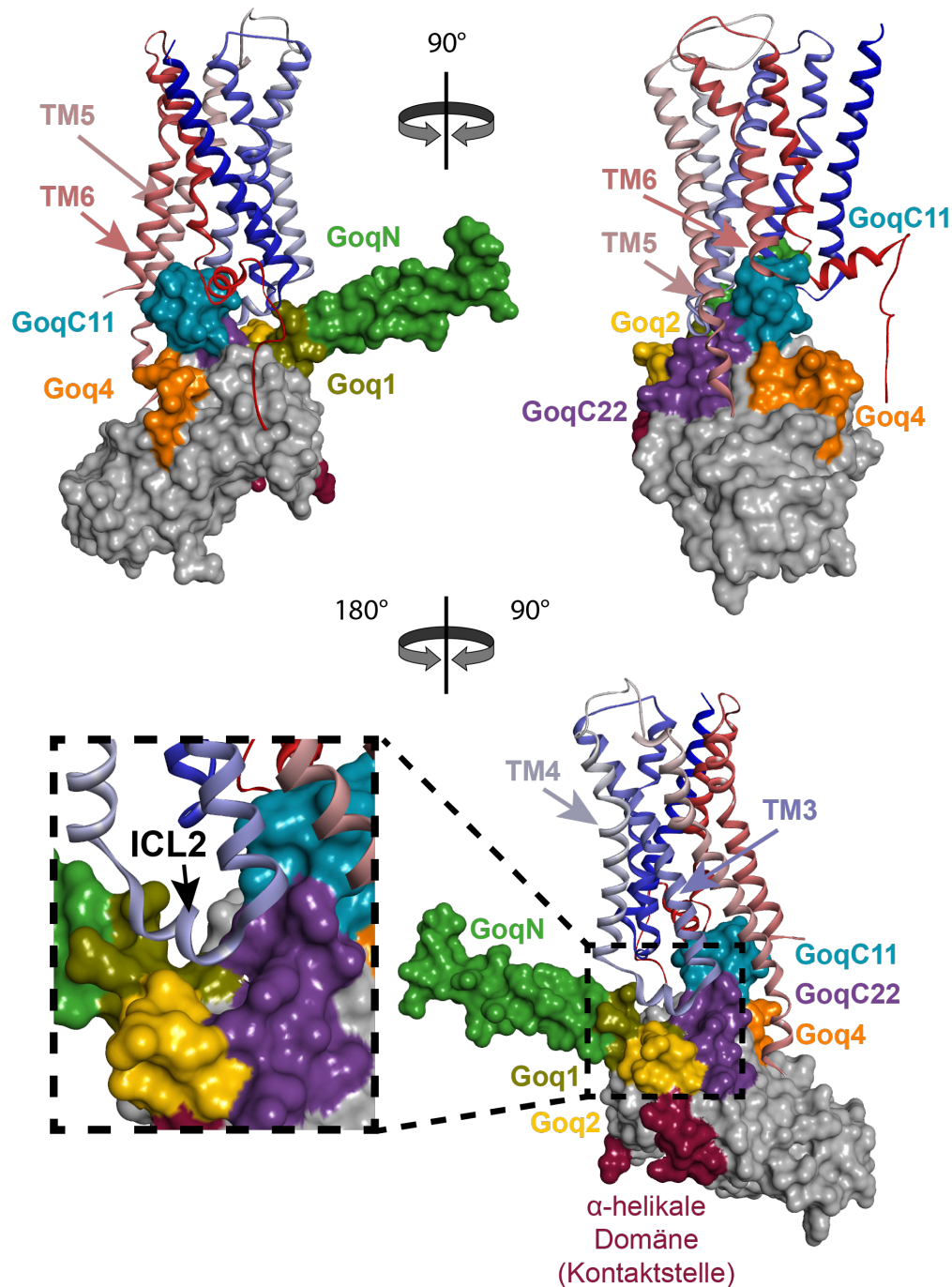


Abb. 55 | Lokalisation chimärer Strukturen auf der $G\alpha$ -Oberfläche

Anhand des M_1R -G11-Komplexes (pdb: 6oij, Maeda et al., 2019) wurden chimäre Strukturen in unterschiedlichen Ansichten der G11-Oberfläche relativ zum M_1R (N- nach C-Terminus) dargestellt. Der vergrößerte Ausschnitt zeigt den zweiten intrazellulären Loop (ICL2) des Rezeptors, der in einen Spalt passt, der durch den $\alpha N/\beta 1$ -Loop, den $\beta 2/\beta 3$ -Loop und die N-terminale $\alpha 5$ -Helix gebildet wird. Das C-terminale Ende der αN -Helix (AS 30-35), das zu Goq1 und GoqN gehört, ist in der Struktur nicht aufgelöst.

Bindung von GoqN-Chimären an den M₃R

Durch den Austausch des N-Terminus in Gao durch Gaq dissoziierten die chimären GoqN-Konstrukte deutlich langsamer vom M₃R als Gao (Abb. 56). Vor allem Doppelchimären wiesen eine stark erhöhte Komplex-Stabilität auf, sodass GoqN+C22, das die N- und C-terminalen Helices von Gaq enthält, fast eine Gq-ähnliche Bindungsstabilität am Rezeptor erzielte.

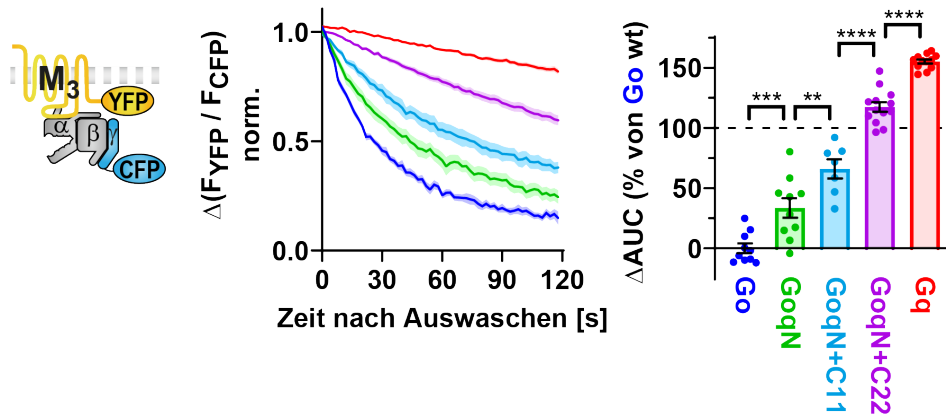


Abb. 56 | Stabilität der Bindung von GoqN-Konstrukten an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=10, GoqN; n=10, GoqN+C11; n=7, GoqN+C22; n=13 und Gq; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ***P < 0,001, **P < 0,01).

Bindung von Goq2-Chimären an den M₃R

Der Austausch des $\beta 2/\beta 3$ -Loops in Gao durch Gaq führte ebenfalls zu einer langsameren Dissoziation von Goq2 und Goq2+C11 vom M₃R (Abb. 57). Dies geschah in einem ähnlichen Muster wie bei den GoqN-Konstrukten (Abb. 56), auch wenn Goq2+C22 keine höhere AUC besaß als Goq2+C11 und deshalb nicht mit der Stabilität des M₃R-GoqN+C22-Komplexes mithalten konnte.

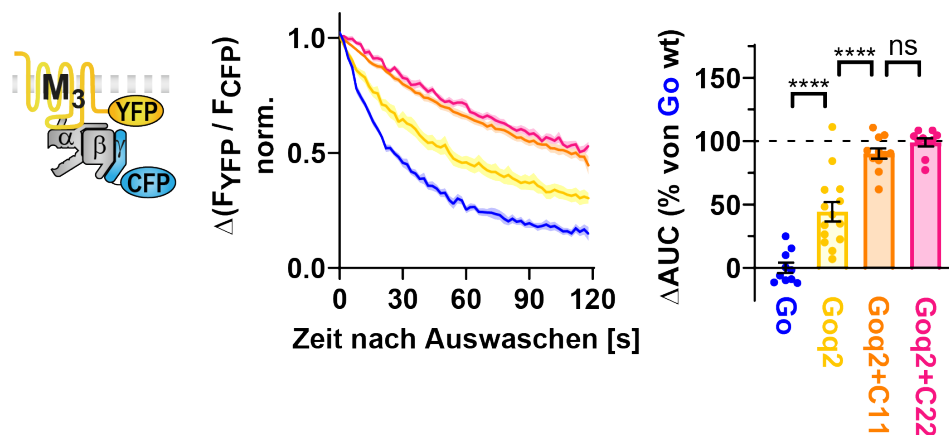


Abb. 57 | Stabilität der Bindung von Goq2-Konstrukten an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=10, Goq2; n=14, Goq2+C11; n=11 und Goq2+C22; n=10 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ns P ≥ 0,05).

Bindung von GoqN+2 Doppelchimären an den M₃R

Da Doppelchimären bisher nur in Kombination mit dem ausgetauschten C-Terminus untersucht wurden, bestätigte folgendes Experiment, dass der chimäre N-Terminus in GoqN zusammen mit dem $\beta 2/\beta 3$ -Loop in Goq2 synergistische Effekte erzielte, da die AUC von GoqN+2, im Vergleich zu Go, fast doppelt so stark erhöht war wie von den Einzelchimären (Abb. 58).

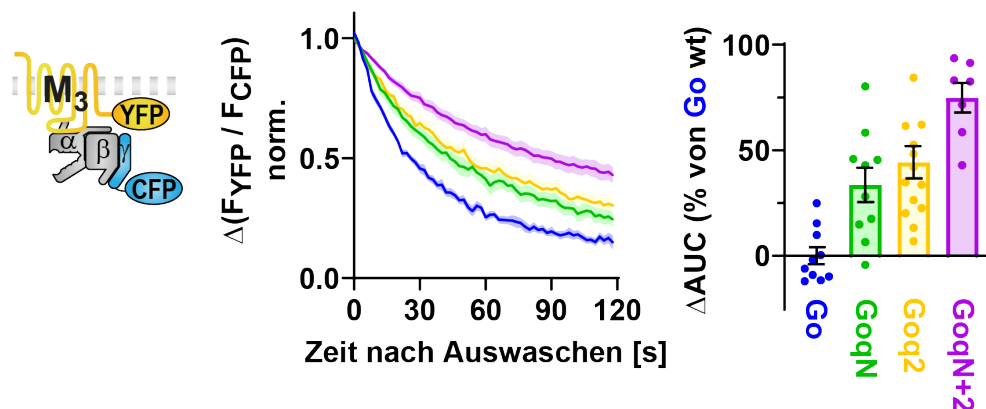


Abb. 58 | Stabilität der Bindung von GoqN+2 an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=10, GoqN; n=10, Goq2; n=14, GoqN+2; n=7 von 2-3 unabhängigen Messtagen).

Aktivierung von GoqN-Chimären durch den M₃R

Aktivierungsmessungen von GoqN-Konstrukten (Abb. 59) zeigten nach links verschobene Kurven, die dem Trend zu erhöhten AUC-Werten in den Bindungsexperimenten (Abb. 56) folgten.

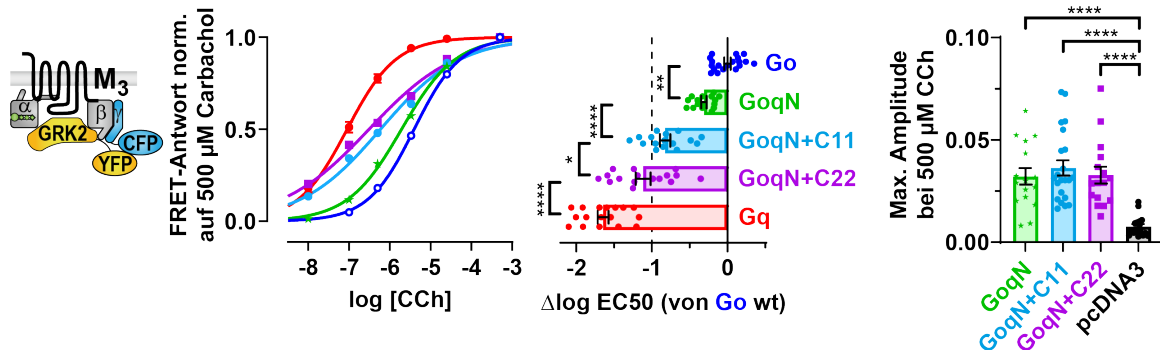


Abb. 59 | Aktivierung von GoqN-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=19, GoqN; n=16, GoqN+C11; n=16, GoqN+C22; n=16, Gq; n=17 und pcDNA3; n=17 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, **P < 0,01, *P < 0,05).

Da die Linksverschiebung der Kurven von Go-basierten Chimären in Abb. 59 zu erkennbar abgeflachten Konzentrations-Wirkungskurven führte, sollten endogene Gi/o-Proteine, die möglicherweise gleichzeitig aktiviert wurden und zu vermischten Aktivierungspotenzen bei hohen CCh-Konzentrationen geführt haben könnten, mit einer Pertussis-Toxin Vorbehandlung (siehe 3.1.4) ausgeschaltet werden. Die PTX-Behandlung führte jedoch nicht zu steileren Kurven (Abb. 60).

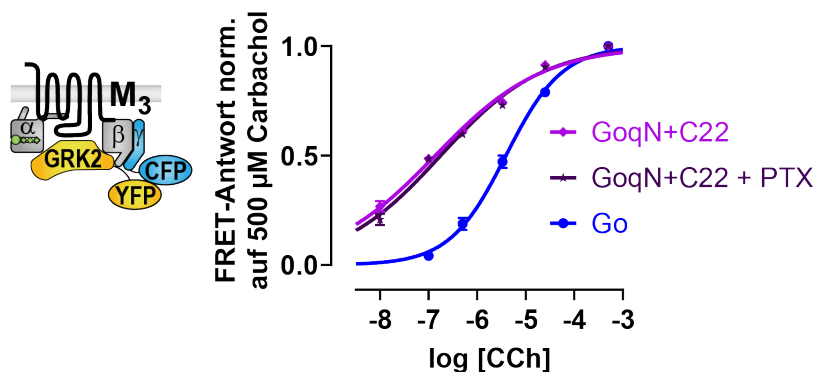


Abb. 60 | Einfluss von PTX auf die Aktivierung von GoqN+C22

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde mit Pertussis-Toxin (PTX) vorbehandelten Zellen (siehe 3.1.4) durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Eine Positivkontrolle für funktionierendes PTX ist in Abb. 49 dargestellt. GoqN+C22 ist selbst PTX-insensitiv durch den C-Terminus von Gαq. (Go; n=8, GoqN+C22; n=8 und GoqN+C22 + PTX; n=8 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (ns P ≥ 0,05).

Aktivierung von Goq2-Chimären durch den M₃R

Für die Goq2-Chimären wurden ebenfalls deutlich erhöhte Aktivierungspotenzen im Vergleich zu Go-WT gemessen (Abb. 61), wobei schon Goq2 die EC₅₀-Werte der GoqN+C11-Doppelchimäre (Abb. 59) erreichte. Die EC₅₀-Werte konnten jedoch durch die Kombination mit ausgetauschten C-Termini, wie in Goq2+C11 oder Goq2+C22, nicht noch weiter nach links verschoben werden.

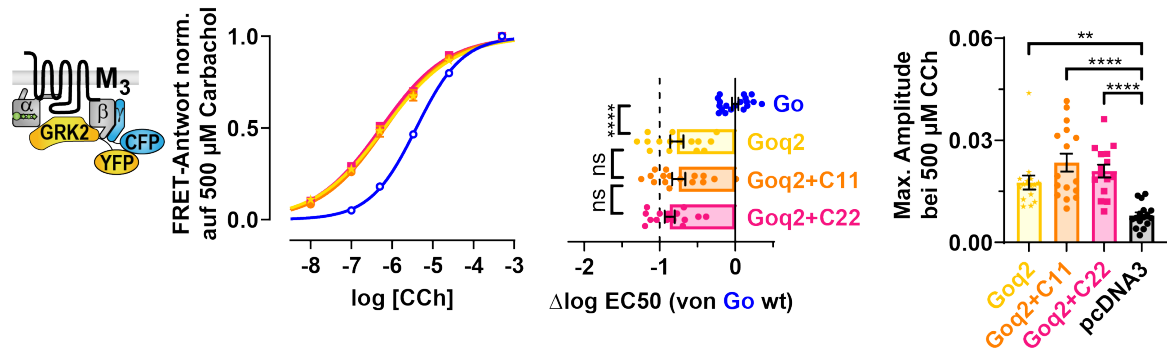


Abb. 61 | Aktivierung von Goq2-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=19, Goq2; n=15, Goq2+C11; n=16, Goq2+C22; n=15 und pcDNA3; n=16 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, **P < 0,01, ns P ≥ 0,05).

Eingrenzung der Aminosäuren in GoqN-Chimären

Um den N-Terminus, der für die Bindungsstabilität am M₃R von zentraler Bedeutung war, weiter einzugrenzen, wurden zusätzliche Ga-Chimären (Goq1, Goq1+C11 und Goq1+C22) generiert, die nur 11 Aminosäuren des αN/β1-Loops von Gaq enthielten, anstatt der 40 AS des gesamten N-Terminus (siehe Abb. 53, Abb. 54, Abb. 55). In den Bindungsexperimenten zeigten die Goq1-Konstrukte größtenteils ähnliche Dissoziationskinetiken wie ihre GoqN-Pendants (Abb. 62), sodass die verbesserten Bindungsstabilitäten der GoqN-Chimären vermutlich dem eingegrenzten Abschnitt des αN/β1-Loops zugeschrieben werden können.

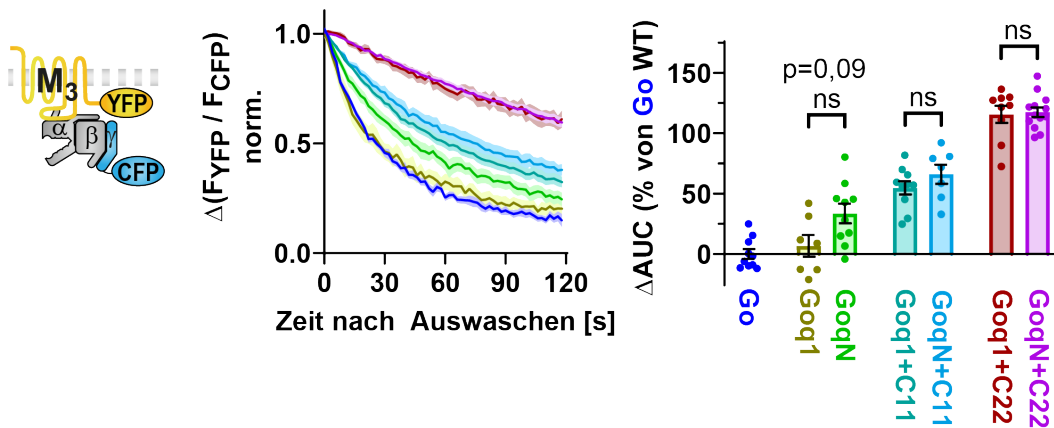


Abb. 62 | Vergleich der Bindungsstabilität zwischen Goq1- und GoqN-Konstrukten an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=10, Goq1; n=7, GoqN; n=10, Goq1+C11; n=10, GoqN+C11; n=7, Goq1+C22; n=9 und GoqN+C22; n=13 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (ns $P \geq 0,05$).

In den Aktivierungsmessungen zeigten die Goq1-Konstrukte im Vergleich zu den GoqN-Varianten jedoch sehr kleine Amplituden, die kaum über denen der endogenen G α -UE (pcDNA3) lagen (rechtes Schaubild, Abb. 63). Durch die schwache Aktivierung kam es daher vermutlich zu vermischten EC₅₀-Werten mit den weniger potenten endogenen G-Proteinen, sodass es keine nennenswerten Linksverschiebungen der Goq1-Konstrukte gab (Abb. 63). Aus diesem Grund lässt sich keine zuverlässige Aussage zur Aktivierung der Goq1-Konstrukte treffen, weshalb im weiteren Verlauf dieser Arbeit nur noch der chimäre Austausch des ganzen N-Terminus behandelt wird.

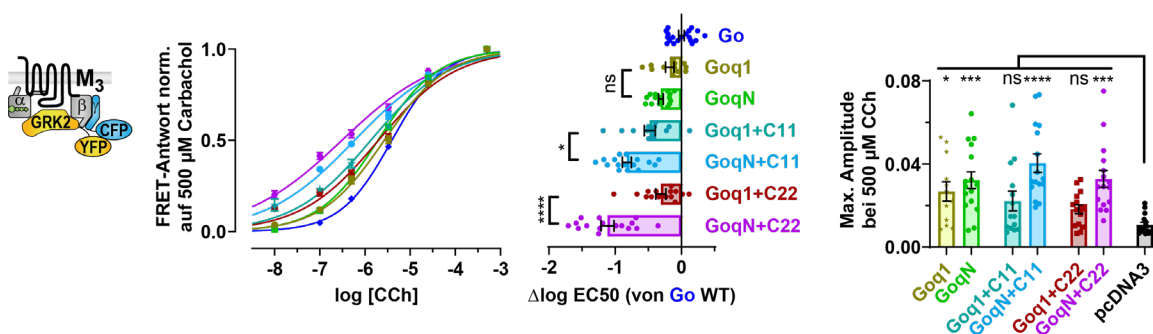


Abb. 63 | Vergleich der Aktivierung zwischen Goq1- und GoqN-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=19, Goq1; n=12, GoqN; n=16, Goq1+C11; n=14, GoqN+C11; n=16, Goq1+C22; n=15, GoqN+C22; n=16 und pcDNA3; n=15 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Bindungs- und Aktivierungsmessungen von Goq4-Chimären mit dem M₃R

Die Goq4-Chimären, die den $\alpha 4/\beta 6$ -Loop von Gaq enthalten, der sich in räumlicher Nähe zum ICL3 des Rezeptors befindet, wurden ebenfalls mit dem M₃R untersucht. In Bindungsexperimenten dissoziierte Goq4 jedoch ähnlich schnell vom Rezeptor wie Go, da beide frühzeitig dasselbe Plateau erreichten, auch wenn der Unterschied der AUCs theoretisch knapp signifikant war (Abb. 64).

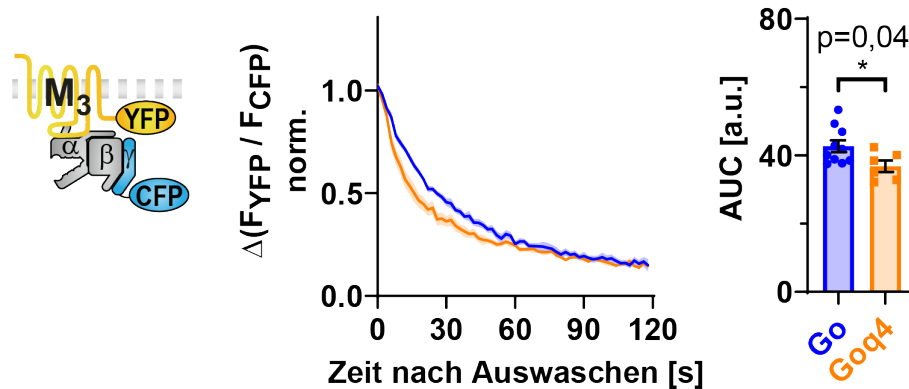


Abb. 64 | Stabilität der Bindung von Goq4-Konstrukten an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert. (Go; n=10 und Goq4; n=6 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (*P < 0,05).

In Aktivierungsmessungen konnten Goq4-Chimären ebenfalls nicht von Go unterschieden werden (Abb. 65). Daher scheint der $\alpha 4/\beta 6$ -Loop keine essentielle Rolle für die Kopplungsspezifität mit dem M₃R zu spielen.

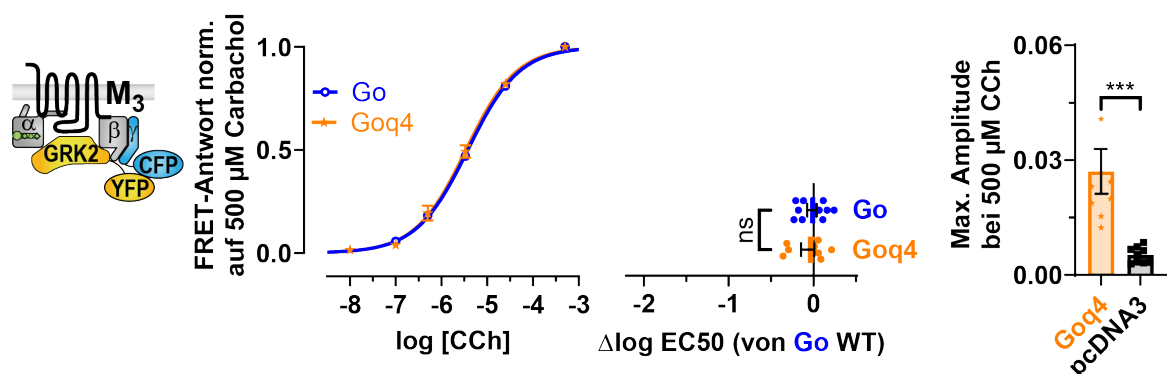


Abb. 65 | Aktivierung von Goq4-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=10, Goq4; n=8; und pcDNA3; n=9 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurden zweiseitige t-Tests durchgeführt (***P < 0,001, ns P ≥ 0,05).

Fazit der Goq-Chimären

Die Experimente mit chimären Goq-Proteinen haben gezeigt, dass nicht nur die N-terminale $\alpha 5$ -Helix von Gaq die Bindungsstabilität sowie die Kopplungseffizienz gegenüber dem M_3R erhöht, sondern, dass auch die αN -Helix mit der Verbindung zum $\beta 1$ -Faltblatt und Teile der $\beta 2/\beta 3$ -Faltblätter, inklusive ihrer Verknüpfung, die Bindung und Aktivierung durch den M_3R verbessern. Darüber hinaus führt die Kombination dieser Strukturen mit der $\alpha 5$ -Helix von Gaq zu einer fast vollständigen Übertragung von Gq-artigen Kopplungseigenschaften auf Go-basierte Doppelchimären.

4.1.3 | Untersuchung von chimären Gq-Proteinen mit dem M_3R

Um zu untersuchen, ob die Kopplungseigenschaften zwischen den G-Protein-Klassen auch andersherum getauscht werden können, wurden Gq-basierte Ga-Chimären, die Aminosäuren von Gao enthalten, in Analogie zu den Goq-Chimären generiert und ebenfalls in Bezug auf ihre Bindungsstabilität und ihre Kopplungseffizienz mit dem M_3R getestet. Die Abschnitte, die in Gaq durch Gao ersetzt wurden, sind in Abb. 66 schematisch dargestellt

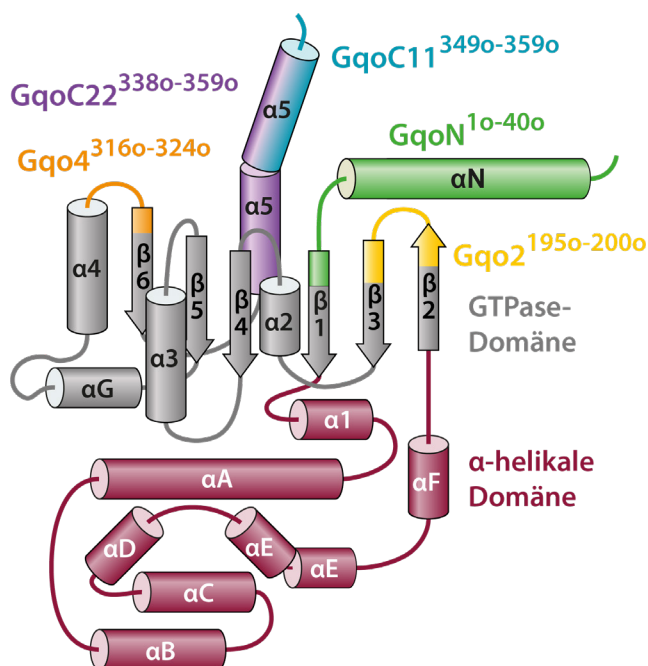


Abb. 66 | Schematische Struktur von Gaq

Eingefärbte Segmente in der schematischen G-Protein-Struktur zeigen die Aminosäuren in Gaq, die durch die entsprechenden AS von Gao in chimären Gqo-UE ersetzt wurden.

Details der ausgetauschten Aminosäuren sind in folgendem *Snake-Plot* dargestellt (Abb. 67).

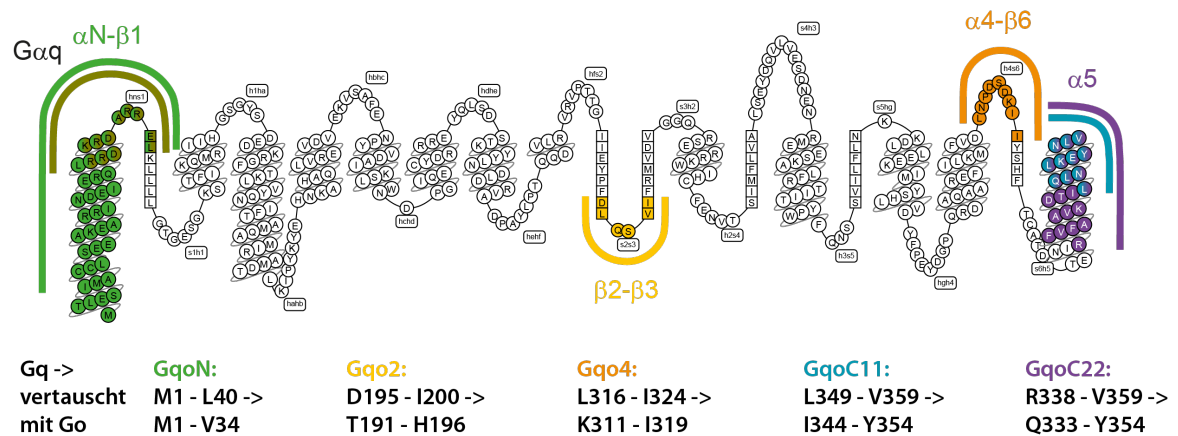


Abb. 67 | Snake-Plot von Gaq

Der *Snake-Plot* wurde der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen und entsprechend eingefärbt.

Die chimären Gqo-Strukturen sind an denselben Stellen wie die Goq-Strukturen lokalisiert und sind daher analog zu Abb. 55 anhand der dreidimensionalen Oberfläche der α -UE im M_1R -G11-Komplex (pdb: 6ojj, Maeda et al., 2019) farblich dargestellt (Abb. 68).

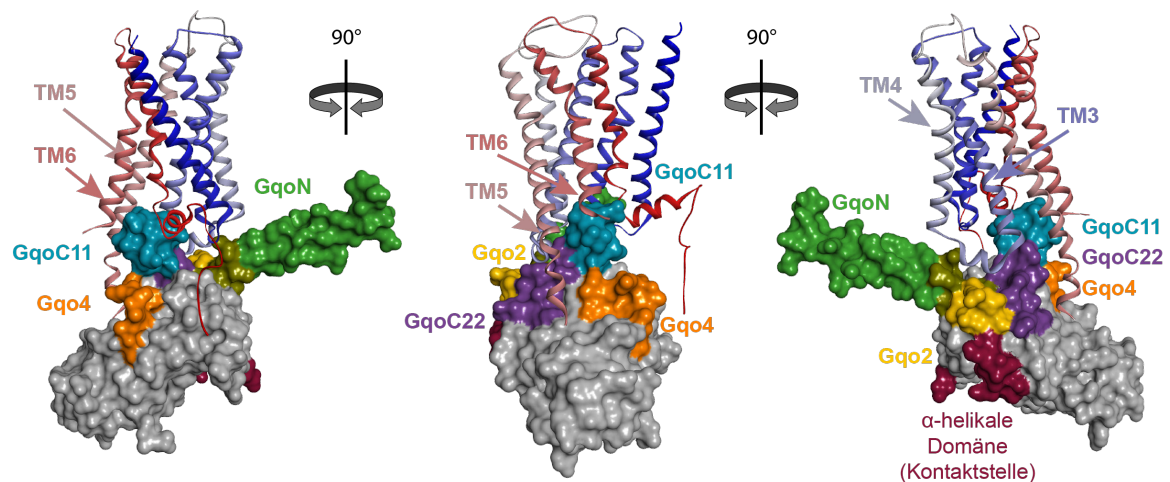


Abb. 68 | Lokalisation chimärer Strukturen auf der α -Oberfläche

Anhand des M_1R -G11-Komplexes (pdb: 6ojj, Maeda et al., 2019) wurden chimäre Strukturen in unterschiedlichen Ansichten der G11-Oberfläche relativ zum M_1R (N- nach C-Terminus) dargestellt. Das C-terminale Ende der α N-Helix (AS 30-35), das zu GqoN gehört, ist in der Struktur nicht aufgelöst.

Bindung von GqoN-Chimären an den M₃R

Das Ersetzen des N-Terminus in Gq durch Gao hatte im Gegensatz zu den GqoN-Chimären keinen nennenswerten Einfluss auf die Bindungsstabilität. Die am M₃R erwarteten schnelleren Dissoziationskinetiken blieben aus, da GqoN und Gq in etwa die gleiche AUC besaßen (Abb. 69). Die GqoN+C11 Doppelchimäre dissoziierte ebenfalls nur etwa 5% schneller vom M₃R als Gq.

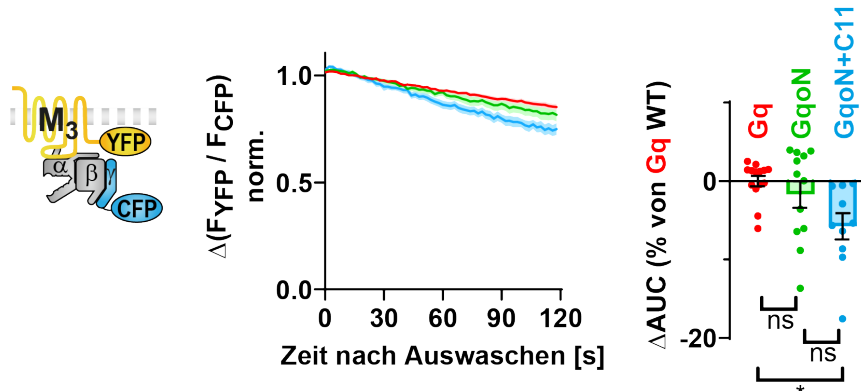


Abb. 69 | Stabilität der Bindung von GqoN-Konstrukten an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Gq-WT dargestellt. (Gq; n=14, GqoN; n=12 und GqoN+C11; n=10 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (* $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Bindung von Gqo2-Chimären an den M₃R

Ähnliche Ergebnisse lieferte auch der chimäre Tausch des $\beta 2/\beta 3$ -Loops in Gqo2 und Gqo2+C11. Die Bindungsstabilitäten dieser $G\alpha$ -Chimären am M₃R waren im Vergleich zu Gq ebenfalls kaum verändert (Abb. 70).

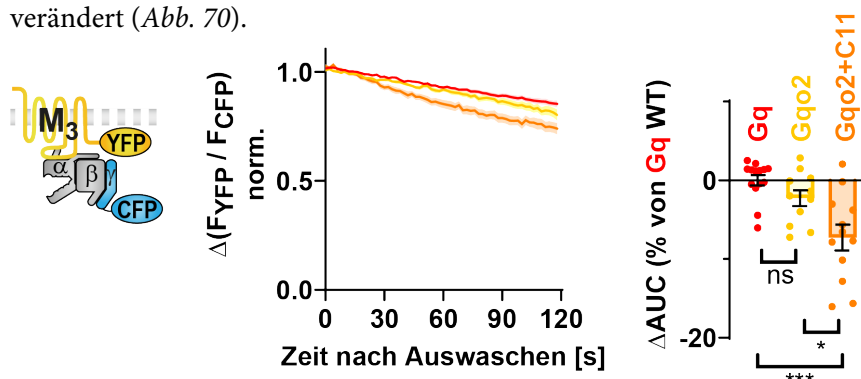


Abb. 70 | Stabilität der Bindung von Gqo2-Konstrukten an den M₃R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Gq-WT dargestellt. (Gq; n=14, Gqo2; n=11 und Gqo2+C11; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (*** $P < 0,001$, * $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Aktivierung von GqoN-Chimären durch den M₃R

Im Gegensatz zu den Bindungsexperimenten wurden GqoN-Konstrukte jedoch deutlich schwächer aktiviert als Gq. Die Kurve von GqoN war stark nach rechts verschoben und die von GqoN+C11 sogar so weit, dass sie nicht mehr von Gao zu unterscheiden war (Abb. 71).

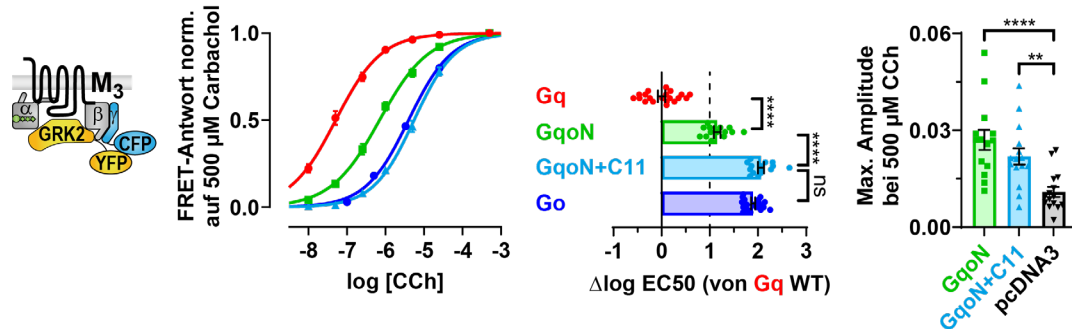


Abb. 71 | Aktivierung von GqoN-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=20, GqoN; n=14 GqoN+C11; n=15, Go; n=19 und pcDNA3; n=15 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, **P < 0,01, ns P ≥ 0,05).

Aktivierung von Gqo2-Chimären durch den M₃R

Im Vergleich zu GqoN (Abb. 71) zeigte Gqo2 keine reduzierte Aktivierungspotenz gegenüber Gq (Abb. 72). Die Doppelchimäre Gqo2+C11 erreichte dagegen wieder nur das Niveau von Gao, was damit erklärt werden kann, dass der alleinige Austausch der α5-Helix in GqoC11 schon zu einer starken Rechtsverschiebung führte (Abb. 50).

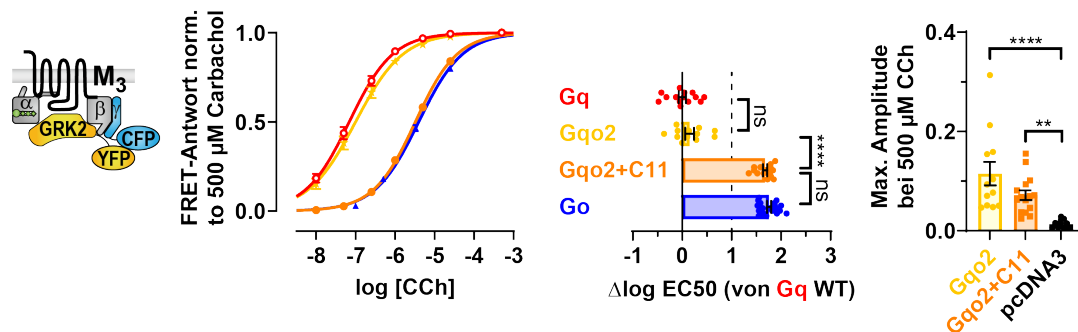


Abb. 72 | Aktivierung von Gqo2-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=14, Gqo2; n=12, Gqo2+C11; n=15, Go; n=19 und pcDNA3; n=13 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, **P < 0,01, ns P ≥ 0,05).

Bindungs- und Aktivierungsmessungen von GqoC22-Kombinationen mit dem M₃R

Die Doppelchimären GqoN+C22 und Gqo2+C22, mit den vollständig ausgetauschten C22-Termini von Gao, konnten durch den M₃R weder gebunden (Abb. 73) noch aktiviert werden (Abb. 74), wie auch schon zuvor für die GqoC22 Einzelchimäre gezeigt wurde (Bindung siehe Abb. 47, Aktivierung siehe Abb. 51).

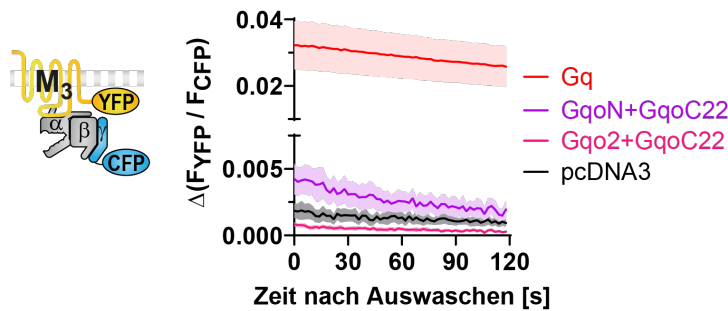


Abb. 73 | Gestörte Bindung von GqoC22 Doppelchimären an den M₃R

Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Absolute Amplituden von GqoN+C22 (n=12) und Gqo2+C22 (n=10) zeigen kein detektierbares FRET-Signal über endogenen G-Proteinen (pcDNA3; n=12). (Gq; n=12).

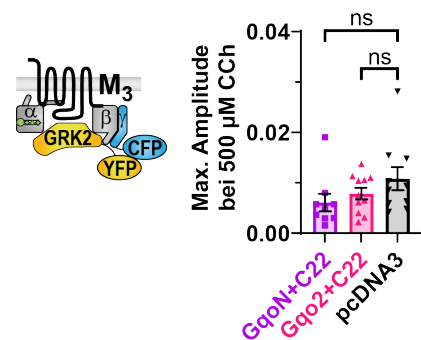


Abb. 74 | Aktivierung von GqoC22 Doppelchimären durch den M₃R

Maximale Amplituden der Gα-Aktivierung wurden gemessen, wie unter (3.6, Abb. 42) beschrieben. (GqoN+C22; n=9, Gqo2+C22; n=11 und pcDNA3; n=14 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnett-Posttest, für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3, durchgeführt (ns P ≥ 0,05).

Bindungs- und Aktivierungsmessungen von Gqo4-Chimären mit dem M₃R

Die Gqo4-Chimären, die den α4/β6-Loop von Gao enthalten, verhielten sich in Bindungs- (Abb. 75) und Aktivierungsexperimenten (Abb. 76) ebenfalls identisch zu Gq, in Einklang mit den Gqo4-Pendants, die in ihren Eigenschaften mit Go übereinstimmen (Abb. 64, Abb. 65).

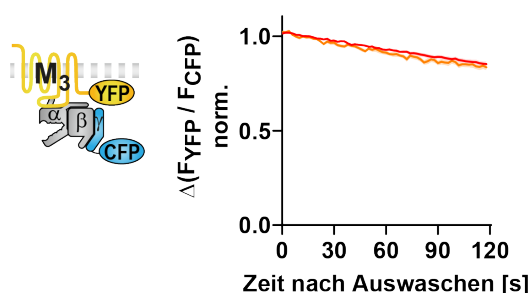
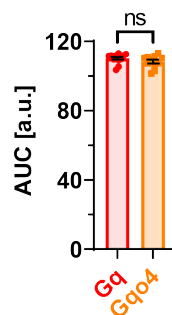


Abb. 75 | Stabilität der Bindung von Gqo4-Konstrukten an den M₃R



Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert. (Gq; n=14 und Gqo4; n=11 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (ns P ≥ 0,05).

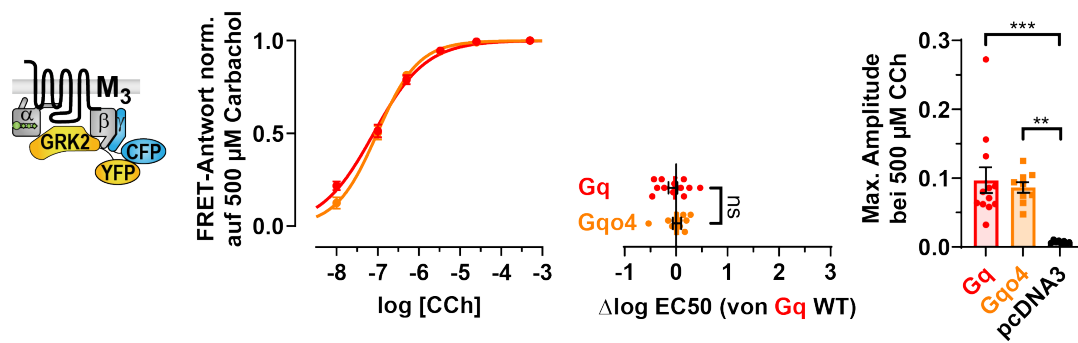


Abb. 76 | Aktivierung von Gqo4-Konstrukten durch den M₃R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=12, Gqo4; n=9 und pcDNA3; n=8 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test (für die EC₅₀-Werte) oder eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (***P < 0,001, **P < 0,01, ns P ≥ 0,05).

Fazit der Gqo-Chimären

Insgesamt werden die Bindungsstabilitäten von Gq-basierten Chimären am M₃R kaum gestört, wenn die Strukturen des N-Terminus, des β2/β3-Loops oder auch der zusätzlichen C-terminalen α5-Helix durch Gao ersetzt werden, wohingegen Go-basierte Chimären in der Lage sind, die deutlich besseren Bindungseigenschaften von den Gaq-Strukturen zu übernehmen (Abb. 56, Abb. 57). Das Grundgerüst des Gq-Proteins gewährleistet dagegen eine gleichbleibend stabile Bindung von Gqo-Chimären an den M₃R, jedoch werden diese Chimären danach während ihrer Aktivierung durch den M₃R selektiert, sodass die Aktivierungspotenzen durch die zuvor genannten Strukturen beeinflusst werden.

4.1.4 | Vergleich von chimären Go-/ Gq-Proteinen mit dem H₁R

Um zu testen, ob die für die Bindungsstabilität und die Kopplungseffizienz mit dem M₃R verantwortlichen Strukturen in der Gα-UE auch auf andere Gq-gekoppelte Rezeptoren übertragen werden können, wurden die Experimente mit denselben Gα-Chimären auch mit dem Histamin H₁-Rezeptor durchgeführt. Dieser hat, auch wenn er nah mit dem M₃R verwandt ist, seine Spezifität gegenüber G-Proteinen vermutlich unabhängig von diesem entwickelt (siehe 1.2.4).

Bindung von Goq-Chimären an den H₁R

Als Erstes wurden Bindungsexperimente zwischen den C-terminal modifizierten Gα-Chimären und dem H₁R, analog zum M₃R, durchgeführt. Durch den kompletten Austausch der α5-Helix in Richtung Gαq verlangsamte sich die Dissoziation von GoqC22 vom H₁R (Abb. 77), ähnlich zum M₃R (Abb. 45). Im Unterschied zum M₃R war die Bindungsstabilität von GoqC11 am H₁R jedoch leicht erhöht, während die Stabilität von GoqC22-11, das nur die N-terminale α5-Helix von Gαq enthält, im Vergleich zu Gαo nicht mehr signifikant erhöht war.

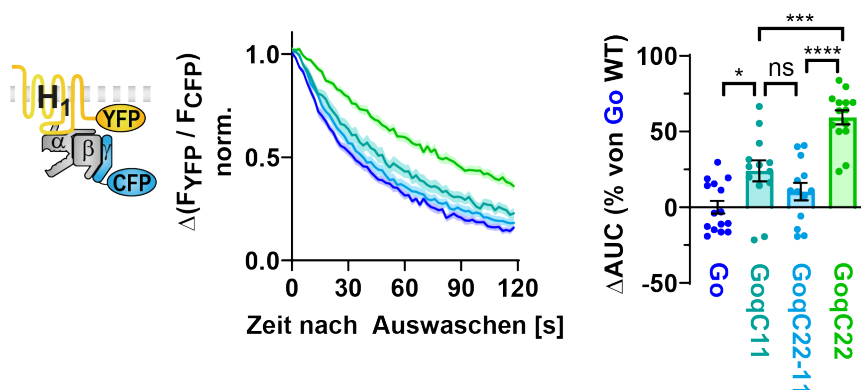


Abb. 77 | Stabilität der Bindung von GoqC-Konstrukten an den H₁R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben, jedoch mit C-terminal mCitrine-markierten H₁R anstatt mCitrine-markierten M₃R und der Stimulation mit 100 μM Histamin anstatt 10 μM ACh. Dissoziationskinetiken von H₁R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=15, GoqC11; n=13, GoqC22-11; n=13 und GoqC22; n=14 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ***P < 0,001, *P < 0,05, ns P ≥ 0,05).

Die Bedeutung des Gq-N-Terminus wurde in folgendem Experiment auch für die Bindung an den H₁R bestätigt (Abb. 78). Die Dissoziation der GoqN-Chimären vom H₁R war sogar langsamer als vom M₃R (Abb. 56), sodass der zusätzliche Austausch des C-Terminus in GoqN+C11 die Bindungsstabilität fast auf das Level von Gq erhöhte, während GoqN+C22 sogar mit Gq gleichzog.

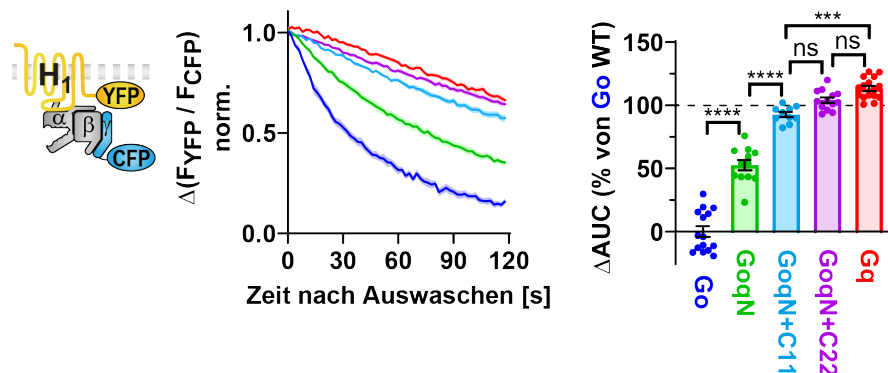


Abb. 78 | Stabilität der Bindung von GoqN-Konstrukten an den H₁R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von H₁R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=15, GoqN; n=12, GoqN+C11; n=10, GoqN+C22; n=13 und Gq; n=16 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ***P < 0,001, ns P ≥ 0,05).

Der $\beta 2/\beta 3$ -Loop von Gαq, der in den Goq2-Konstrukten ausgetauscht wurde, verbesserte im Vergleich zu Go ebenfalls die Stabilität in H₁R-Komplexen (Abb. 79), in Übereinstimmung mit dem M₃R (Abb. 57). Überraschenderweise erreichte aber schon Goq2+C11 die AUC von Gq, wohingegen Goq2+C22 wieder signifikant schneller vom H₁R dissoziierte. Am M₃R war die Bindungsstabilität von Goq2+C22 gegenüber Goq2+C11 zwar nicht erhöht, jedoch auch nicht reduziert.

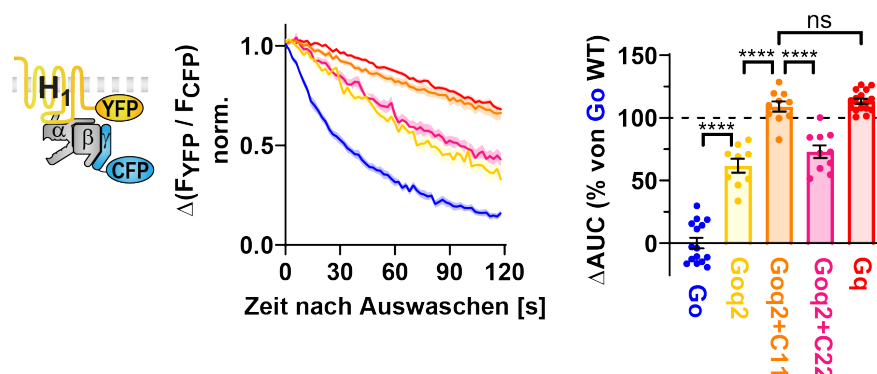


Abb. 79 | Stabilität der Bindung von Goq2-Konstrukten an den H₁R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von H₁R-G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=15, Goq2; n=9, Goq2+C11; n=10, Goq2+C22; n=10 und Gq; n=16 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ns P ≥ 0,05).

Insgesamt deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Gq-Strukturen des $\beta 2/\beta 3$ -Loops und des N- und C-Terminus die Bindungsstabilität von Gq-Chimären am M_3R und H_1R gleichermaßen erhöhen, indem die Gq-artigen Bindungseigenschaften auf das Grundgerüst des Go-Proteins übertragen werden können.

Bindung von Gqo-Chimären an den H_1R

Für Gq-basierte Chimären gab es dagegen einen sichtbaren Unterschied zwischen beiden Rezeptoren. GqoC11 dissoziierte deutlich schneller vom H_1R als Gq (Abb. 80), obwohl die Bindungsstabilität am M_3R nahezu unverändert blieb (Abb. 46). Daher spielen die äußersten 11 Aminosäuren des G α -C-Terminus vermutlich eine wichtigere Rolle für die Stabilität in H_1R -Komplexen als in M_3R -Komplexen.

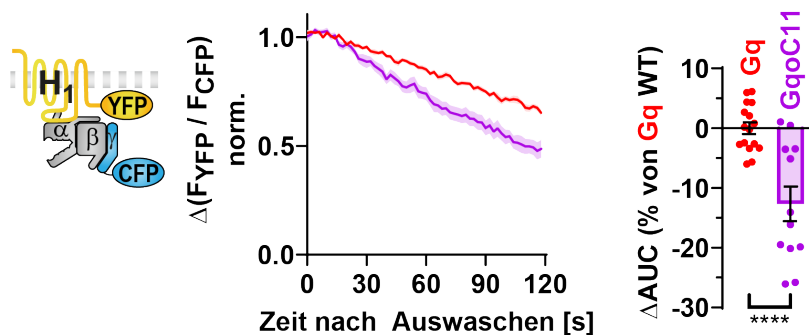


Abb. 80 | Stabilität der Bindung von GqoC-Konstrukten an den H_1R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von H_1R -G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Gq-WT dargestellt. (Gq; n=16 und GqoC11; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (****P < 0,0001).

GqoC22 konnte hingegen an beide Rezeptoren überhaupt nicht mehr binden, da es auch hier keine spezifischen Signale über endogenen G-Proteinen (pcDNA3) zeigte (Abb. 81).

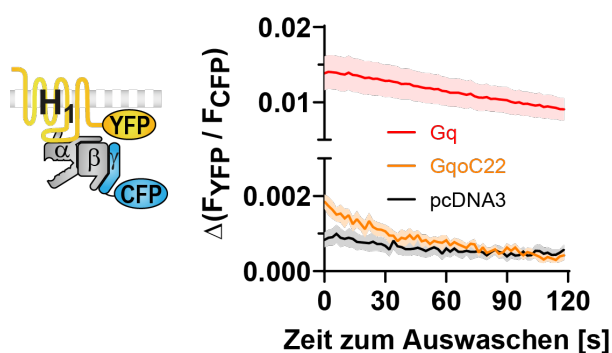


Abb. 81 | Gestörte Bindung von GqoC22 an den H_1R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Absolute Amplituden zeigen, dass für GqoC22 kein FRET-Signal über endogenen G-Proteinen (leerer Vektor anstatt G α -UE transfiziert) detektiert werden konnte. (Gq; n=8, GqoC22; n=8 und pcDNA3; n=7 von 2 unabhängigen Messtagen).

Gqo2, in dem der $\beta 2/\beta 3$ -Loop von Gq durch den von Gao ersetzt wurde, zeigte, im Einklang mit dem M_3R (Abb. 70), weiterhin Gq-ähnliche Kinetiken (Abb. 82). Gqo2+C11 dissoziierte jedoch deutlich schneller vom H_1R als vom M_3R , was allerdings fast ausschließlich dem Einfluss des Go-C-Terminus zugeschrieben werden kann, da schon der alleinige Austausch in der GqoC11-Einzelchimäre zu einer bedeutend schnelleren Dissoziation vom H_1R führte, wie in Abb. 80 gezeigt ist. Der Austausch des $\beta 2/\beta 3$ -Loops in der kombinierten Gqo2+C11-Chimäre beschleunigte die Dissoziation also nur minimal gegenüber GqoC11, ähnlich zum M_3R .

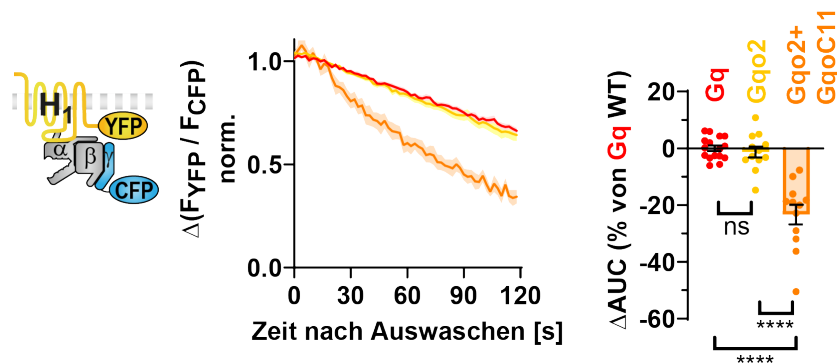


Abb. 82 | Stabilität der Bindung von Gqo2-Konstrukten an den H_1R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von H_1R -G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Gq-WT dargestellt. (Gq; n=16, Gqo2; n=12 und Gqo2+C11; n=12 von 3 unabhängigen Messungen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest durchgeführt (****P < 0,0001, ns P \geq 0,05).

Der Austausch des N-Terminus offenbarte den größten Unterschied zwischen H_1R und M_3R , da GqoN und GqoN+C11 überhaupt nicht mehr an den H_1R binden konnten, da keine spezifischen Signale über endogenen G-Proteinen (pcDNA3) detektiert wurden (Abb. 83a). Außerdem konnte auch keine Aktivierung von GqoN durch den H_1R beobachtet werden, da die Amplituden nicht größer waren als die von pcDNA3 (Abb. 83b). Im Gegensatz dazu konnten die GqoN-Konstrukte problemlos mit dem M_3R interagieren (Abb. 69) und auch weiterhin aktiviert werden (Abb. 71).

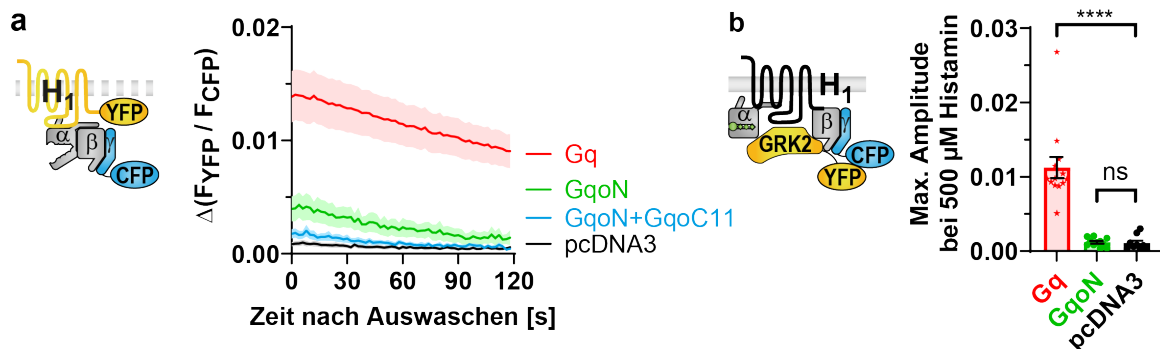


Abb. 83 | Gestörte Bindung und Aktivierung von GqoN-Konstrukten am H_1R

a Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Absolute Amplituden zeigen, dass für GqoN kein FRET-Signal über endogenen G-Proteinen (leerer Vektor anstatt G α -UE transfiziert) detektiert werden konnte. (Gq; n=8, GqoN; n=6, GqoN+C11; n=9 und pcDNA3; n=7 von 2 unabhängigen Messtagen). **b** Maximale Amplituden der G α -Aktivierung wurden gemessen, wie unter (3.6, Abb. 42) beschrieben. (Gq; n=13, GqoN; n=11, pcDNA3; n=9 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, ns P \geq 0,05).

Aktivierung von Goq-Chimären durch den H_1R

Die Konzentrations-Wirkungskurven der G-Protein-Aktivierung lagen deutlich näher beieinander, wenn die G-Proteine durch den H_1R anstatt den M_3R aktiviert wurden. Sie konnten jedoch trotzdem noch unterschieden und miteinander verglichen werden.

Durch den Austausch der $\alpha 5$ -Helix in GoqC-Chimären waren die EC_{50} -Werte nach der Aktivierung durch den H_1R ähnlich weit nach links verschoben (Abb. 84) wie mit dem M_3R (Abb. 48). Obwohl die maximale Amplitude von GoqC22 nicht signifikant höher war als die von pcDNA3 (rechts, Abb. 84), wurde GoqC22 analysiert, da die Signifikanzgrenze nur knapp verfehlt wurde ($p=0,08$) und die EC_{50} -Werte deutlich nach links verschoben waren. Die kleinere Amplitude erklärt aber den etwas niedrigeren Zugewinn an Aktivierungspotenz gegenüber dem M_3R , da weniger potente endogene G-Proteine eher um die Aktivierung durch den H_1R konkurrierten.

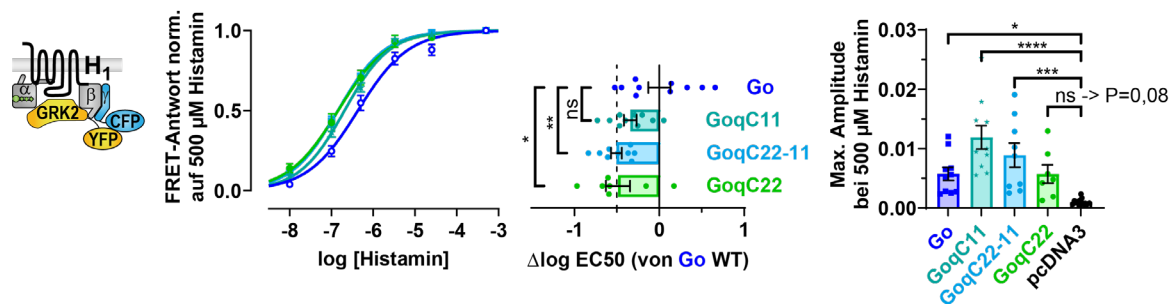


Abb. 84 | Aktivierung von GoqC-Konstrukten durch den H_1R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben, jedoch mit transfiziertem H_1R anstatt M_3R und der Stimulation mit bis zu 500 μM Histamin anstatt 500 μM CCh. Änderungen der EC_{50} -Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; $n=10$, GoqC11; $n=10$, GoqC22-11; $n=9$, GoqC22 und pcDNA3; $n=14$ von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC_{50} -Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (**** $P < 0,0001$, *** $P < 0,001$, ** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Die Aktivierung von Go-basierten Chimären, die die N- und C-terminalen Helices von Gq enthalten (GoqN+C11 und GoqN+C22), konnten erstaunlicherweise sogar die Aktivierungspotenz von Gq übertreffen (Abb. 85). Dies lässt vermuten, dass der H₁R, im Unterschied zum M₃R, für die Gα-Aktivierung eine Struktur im Grundgerüst des Go-Proteins favorisiert und dass die Potenzen durch die N- und C-terminalen Austausche durch Gαq zusätzlich weiter erhöht werden.

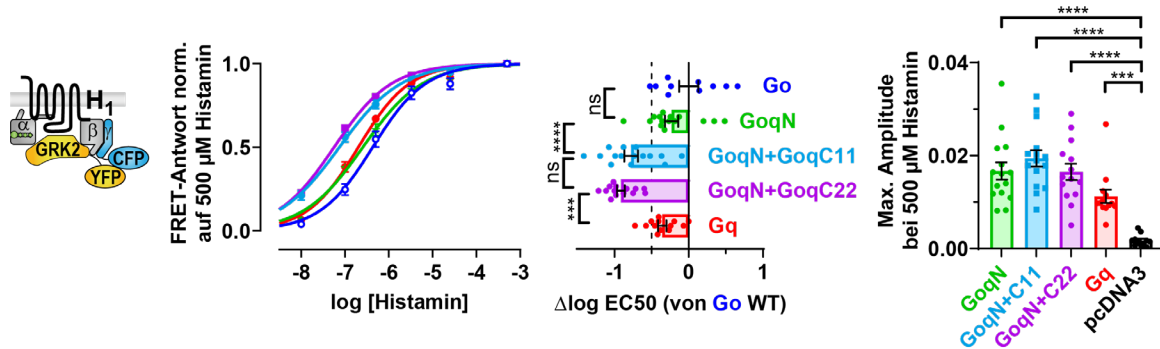


Abb. 85 | Aktivierung von GoqN-Konstrukten durch den H₁R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=10, GoqN; n=15, GoqN+C11; n=15, GoqN+C22; n=14, Gq; n=13 und pcDNA3; n=11 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, ***P < 0,001, ns P ≥ 0,05).

Goq2-basierte Chimären zeigten gleich weit nach links verschobene Konzentrations-Wirkungskurven (Abb. 86), die deshalb genauso unabhängig von einem spezifischen C-Terminus waren wie beim M₃R (Abb. 61).

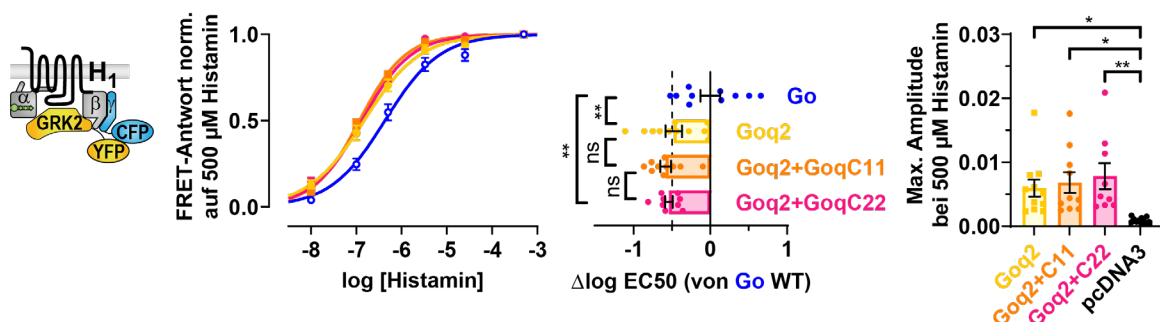


Abb. 86 | Aktivierung von Goq2-Konstrukten durch den H₁R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=10, Goq2; n=11, Goq2+C11; n=10, Goq2+C22; n=9 und pcDNA3; n=11 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (**P < 0,01, *P < 0,05, ns P ≥ 0,05).

Aktivierung von Gqo-Chimären durch den H₁R

Schließlich wurde die Aktivierung der Gq-basierten Chimären durch den H₁R untersucht. Dabei erschien die Kurve von GqoC11 etwa auf dem Level von Go (Abb. 87) und somit kaum weiter nach rechts verschoben als bei der Aktivierung durch den M₃R (Abb. 50). GqoC22, das initial schon nicht binden konnte (Abb. 81), wurde nachfolgend auch nicht durch den H₁R aktiviert (rechts, Abb. 87).

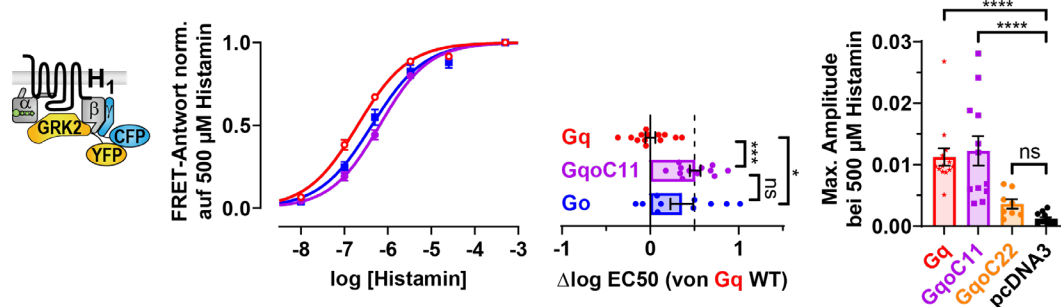


Abb. 87 | Aktivierung von GqoC-Konstrukten durch den H₁R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=13, GqoC11; n=12, Go; n=10, GqoC22; n=12 und pcDNA3; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, ***P < 0,001, *P < 0,05, ns P ≥ 0,05).

Gqo2 zeigte mit dem H₁R eine unveränderte Aktivierungspotenz auf dem Niveau von Gq (Abb. 88), ähnlich zur Aktivierung durch den M₃R (Abb. 72). Die Kurve von Gqo2+GqoC11 erschien jedoch sogar noch weiter nach rechts verschoben als die von Go, wohingegen Go vom M₃R am schwächsten von allen Gα-UE aktiviert wurde. Das liegt vermutlich daran, dass das Grundgerüst des Go-Proteins die Aktivierung durch den H₁R unterstützte, was auch mit GoqN+C11 und GoqN+C22 zu sehen war, die durch den H₁R sogar besser aktiviert wurden als Gq (Abb. 85).

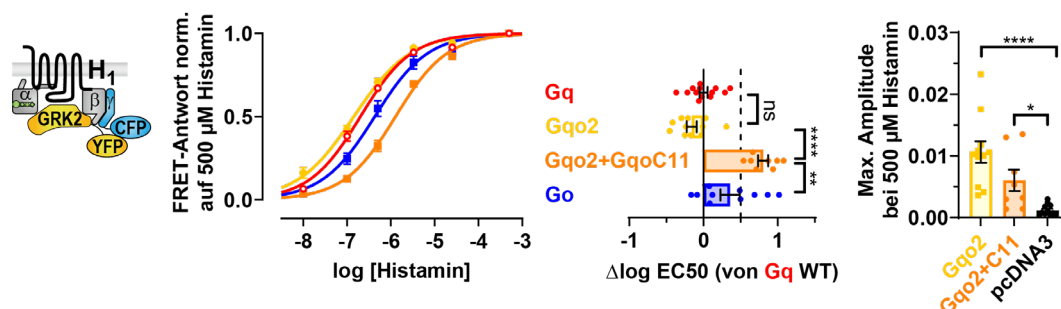


Abb. 88 | Aktivierung von Gqo2-Konstrukten durch den H₁R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=13, Gqo2; n=11, Gqo2+C11; n=8, Go; n=10 und pcDNA3; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde eine einfache ANOVA gefolgt von einem Tukey-Posttest (für die EC₅₀-Werte) oder einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (****P < 0,0001, **P < 0,01, *P < 0,05, ns P ≥ 0,05).

Bindung und Aktivierung von Goq4 und Gqo4

Der Austausch des $\alpha 4/\beta 6$ -Loops in Goq4 und Gqo4 konnte weder die Bindungsstabilität am Rezeptor, noch die Aktivierungspotenzen gegenüber den nativen G-Proteinen sowohl mit dem H_1R als auch mit dem M_3R verändern. Goq4 zeigte die gleichen Dissoziationskinetiken wie Go (Abb. 89), während sich die EC50-Werte zwischen Goq4 und Go ebenfalls nicht unterschieden (Abb. 90).

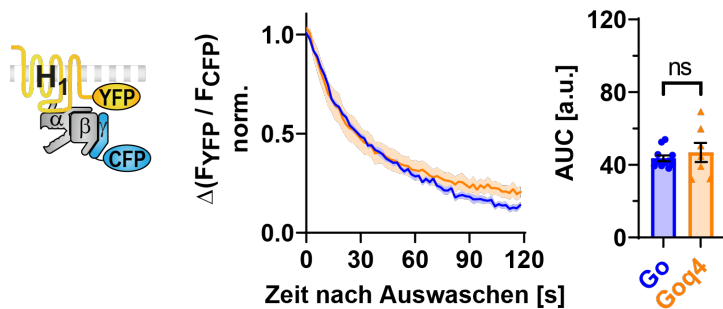


Abb. 89 | Stabilität der Bindung von Goq4-Konstrukten an den H_1R

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von H_1R -G-Protein-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (ΔAUC) zu Go-WT dargestellt. (Go; n=11 und Goq4; n=7 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (ns $P \geq 0,05$).

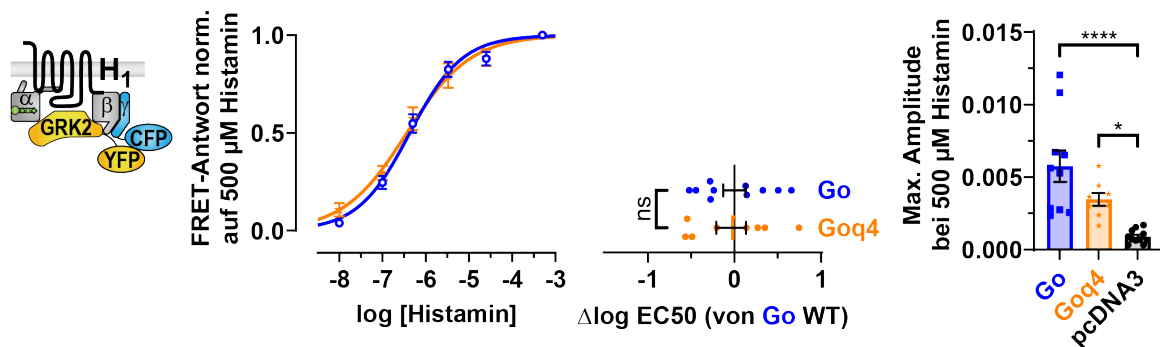


Abb. 90 | Aktivierung von Goq4-Konstrukten durch den H_1R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC50-Werte wurden relativ zu Go-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Go; n=10, Goq4; n=8 und pcDNA3; n=11 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test (für die EC50-Werte) oder eine einfache ANOVA gefolgt einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (**** $P < 0,0001$, * $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Im Einklang dazu zeigte Gqo4 mit dem H₁R Gq-ähnliche Dissoziationskinetiken (Abb. 91) und EC₅₀-Werte (Abb. 92).

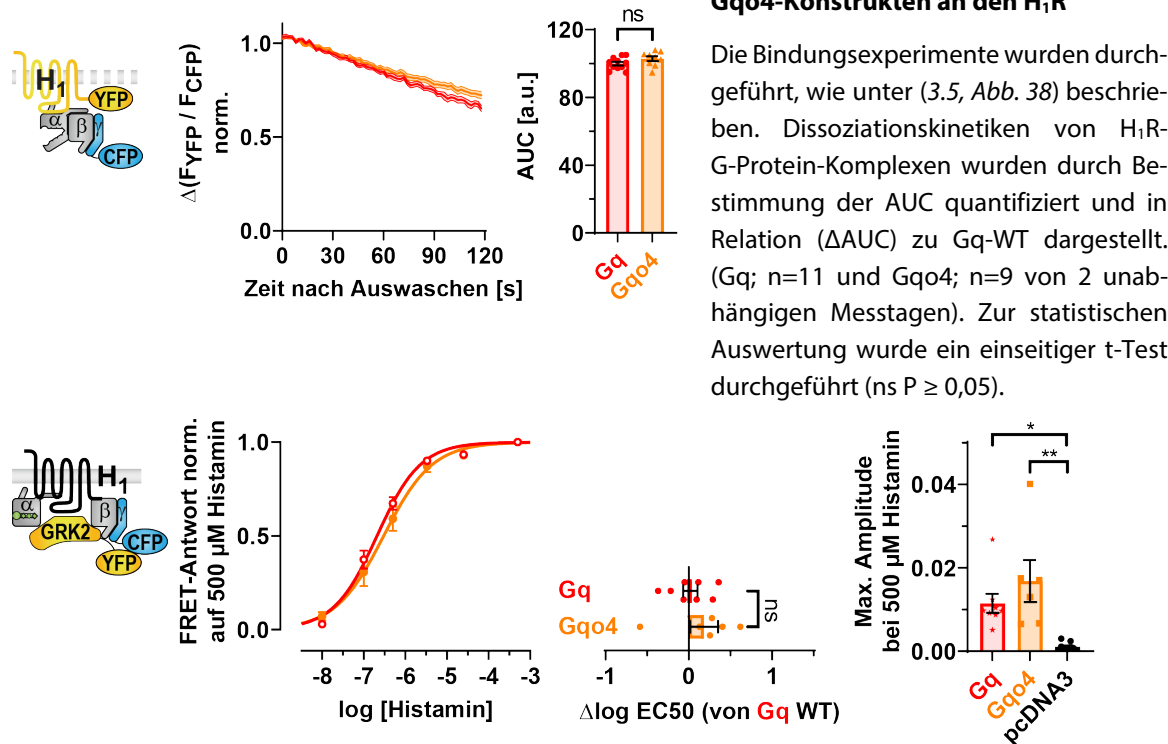


Abb. 92 | Aktivierung von Gqo4-Konstrukten durch den H₁R

Die indirekte Messung der G-Protein-Aktivierung wurde durchgeführt, wie unter (3.6, Abb. 40, Abb. 41 und Abb. 42) beschrieben. Änderungen der EC₅₀-Werte wurden relativ zu Gq-WT in horizontalen Balken dargestellt. (Gq; n=8, Gqo4; n=6 und pcDNA3; n=9 von 2 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test (für die EC₅₀-Werte) oder eine einfache ANOVA gefolgt einem Dunnett-Posttest (für den Vergleich der maximalen Amplituden gegen pcDNA3) durchgeführt (** $P < 0,01$, * $P < 0,05$, ns $P \geq 0,05$).

Fazit der Ga-Chimären, die mit dem H₁R im Vergleich zum M₃R gemessen wurden

Zusammengefasst sind Strukturen wie der β 2/ β 3-Loop zusammen mit dem N- und C-Terminus der G α -UE essentiell für die ordnungsgemäße Bindung und Aktivierung durch den H₁R, genauso wie auch für den M₃R. Die Selektivität kann jedoch je nach Rezeptor zu unterschiedlichen Zeitpunkten während des Kopplungsprozesses ausgeübt werden, in Abhängigkeit von der untersuchten Struktur. Die ausgetauschte C-terminale α 5-Helix in GqoC11 verschlechtert z.B. schon die Bindung zum H₁R, wohingegen für den M₃R nur die nachgeschaltete Aktivierung beeinträchtigt ist. Dasselbe gilt für den Go-N-Terminus in GqoN, der die Bindung zum H₁R komplett verhindert, jedoch für den M₃R nur die nachfolgende Aktivierung verschlechtert. Dennoch werden die meisten G α -Chimären von beiden Rezeptoren bereits spezifisch auf Ebene der initialen Bindung selektiert.

4.1.5 | Vergleich von M₃- und H₁-Rezeptoren in *Heatmaps*

Für eine Vergleichsübersicht wurden die Daten von Bindungsexperimenten aller gemessenen Gα-Chimären für beide Rezeptoren nebeneinander in *Heatmaps* dargestellt (Abb. 93). Insgesamt gab es nur kleine Unterschiede in der Bindung von Gα-Chimären zwischen M₃R oder H₁R (ähnlich gefärbte Kacheln), mit Ausnahme der GqoN-Konstrukte, die zwar an den M₃R, aber nicht an den H₁R binden konnten (dargestellt als schwarze Kacheln). Insgesamt lässt sich sagen, dass beide Gq-gekoppelte Rezeptoren die Gα-UE selektiv durch den N-Terminus, den β2/β3-Loop und den C-Terminus erkennen, was vor allem an den tiefroten Kacheln zu erkennen ist, die die erhöhte Bindungsstabilität durch chimäre Gq-Strukturen in einem Go-Grundgerüst anzeigen.

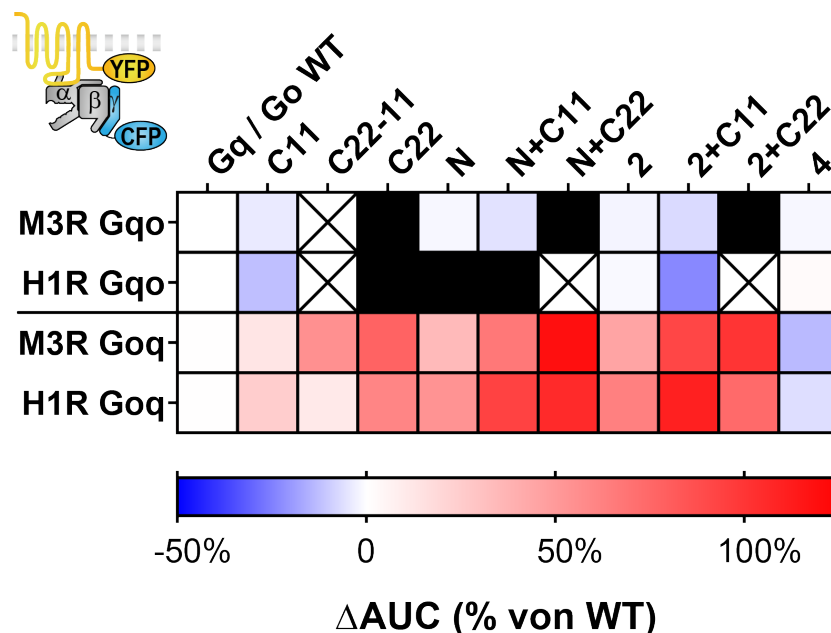


Abb. 93 | Übersicht der G-Protein-Bindungsexperimente mit M₃R und H₁R

Bindungsexperimente von chimären G-Proteinen sind Seite an Seite zusammengefasst. Zeilen beschreiben die untersuchten Rezeptoren und G-Protein-Klassen von denen die chimären Konstrukte abstammen. Spalten benennen die Abschnitte, die durch die Aminosäuren der jeweils anderen G-Protein-Klasse ersetzt wurden. Die Lokalisation der Strukturen ist in Abb. 53, Abb. 54, Abb. 55 dargestellt. Alle Kacheln repräsentieren Mittelwerte der Stabilität von Rezeptor-G-Protein-Komplexen in permeabilisierten Zellen relativ zu Wildtyp-G-Proteinen (ΔAUC). Schwarze Kacheln zeigen, dass keine Bindung möglich war, während gekreuzte anzeigen, dass keine Daten für das Konstrukt erfasst wurden. Rote Kacheln repräsentieren eine längere, blaue eine niedrigere Bindungsstabilität am Rezeptor, relativ zu Wildtyp-G-Proteinen in weißen Kacheln.

Die G-Protein-Aktivierungsmessungen wurden ebenfalls alle in einer *Heatmap* zusammengefasst (Abb. 94). Insgesamt korrelierten die Veränderungen der Aktivierungspotenzen dabei gut mit den jeweiligen Bindungsexperimenten (Abb. 93), mit Ausnahme der durch M₃R aktivierten Gqo-Chimären, die meistens starke Potenzverluste (tiefblaue Kacheln, Abb. 94) im Gegensatz zu nahezu unveränderten Bindungsstabilitäten am M₃R (hellblaue Kacheln, Abb. 93,) zeigten. Dies lässt vermuten, dass die Kopplungsspezifität des M₃Rs für Gq-basierte G-Proteine noch nicht initial während der Bindung, sondern erst später in der nachgeschalteten Aktivierung ausgeübt wird.

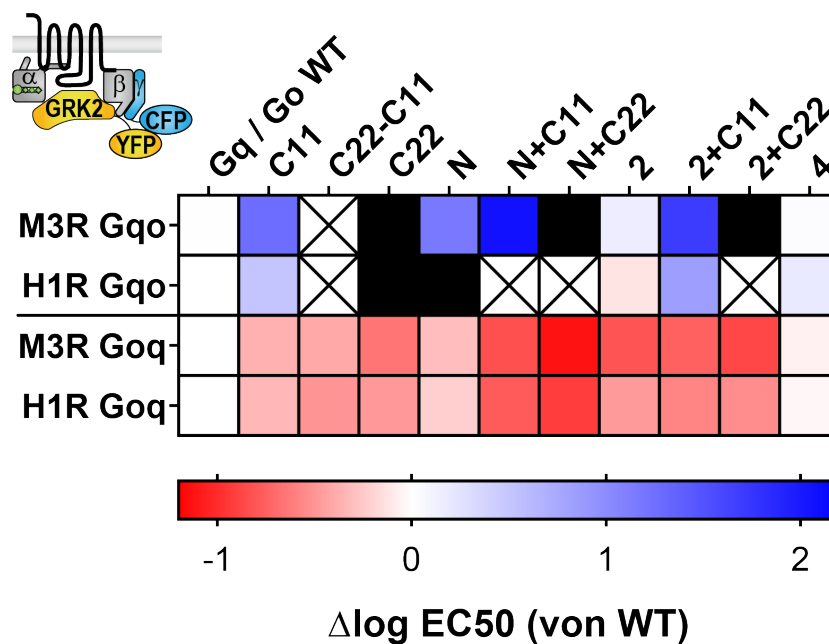


Abb. 94 | Übersicht der G-Protein-Aktivierungsexperimente mit M₃R und H₁R

G-Protein-Aktivierungsmessungen von chimären G-Proteinen sind Seite an Seite zusammengefasst. Zeilen beschreiben die untersuchten Rezeptoren und G-Protein-Klassen von denen die chimären Konstrukte abstammen. Spalten benennen die Abschnitte, die durch die Aminosäuren der jeweils anderen G-Protein-Klasse ersetzt wurden. Die Lokalisation der Strukturen ist in Abb. 53, Abb. 54, Abb. 55 dargestellt. Alle Kacheln repräsentieren gemittelte EC₅₀-Werte relativ zu Wildtyp-G-Proteinen. Schwarze Kacheln zeigen, dass keine Aktivierung möglich war, während gekreuzte anzeigen, dass keine Daten für das Konstrukt erfasst wurden. Rote Kacheln repräsentieren eine bessere, blaue eine schlechtere Aktivierungspotenz, relativ zu Wildtyp-G-Proteinen in weißen Kacheln.

4.2 | Einfluss von Rezeptorstrukturen auf die Kopplungsspezifität

Im zweiten Teil dieser Arbeit wurden strukturelle Elemente im Rezeptor statt in der Gα-UE hinsichtlich ihres Einflusses auf die Bindungsstabilität von Gq-WT bzw. Go-WT untersucht. Die Ergebnisse sind jedoch als vorläufig zu betrachten, weil sie zum großen Teil auf präliminären Experimenten beruhen, die noch nicht ausreichend reproduziert wurden. Da die Daten deshalb teilweise nur einen ersten Eindruck vermitteln können, wurde keine statistische Analyse durchgeführt.

4.2.1 | Untersuchung von Punktmutationen im M₃R

Um die Kopplungseigenschaften vom M₃R gegenüber Gq- oder Go-Proteinen zu verändern, wurden zuerst Punktmutationen in intrazellulären Bereichen der transmembranären Helices in den M₃R eingefügt (Abb. 95). Die Mutationsstellen wurden durch ein strukturbasiertes Alignment aller muskarinergen Rezeptoren bestimmt (Abb. 96), indem konservierte Aminosäuren in Gq-koppelnden M₁R, M₃R und M₅R identifiziert wurden, die sich von Gi/o-koppelnden M₂R und M₄R unterschieden. Diese wurden im M₃R durch die entsprechenden Aminosäuren des anders koppelnden M₂Rs ersetzt, da erwartet wurde, dass dies die Kopplungsspezifität beeinflusst.

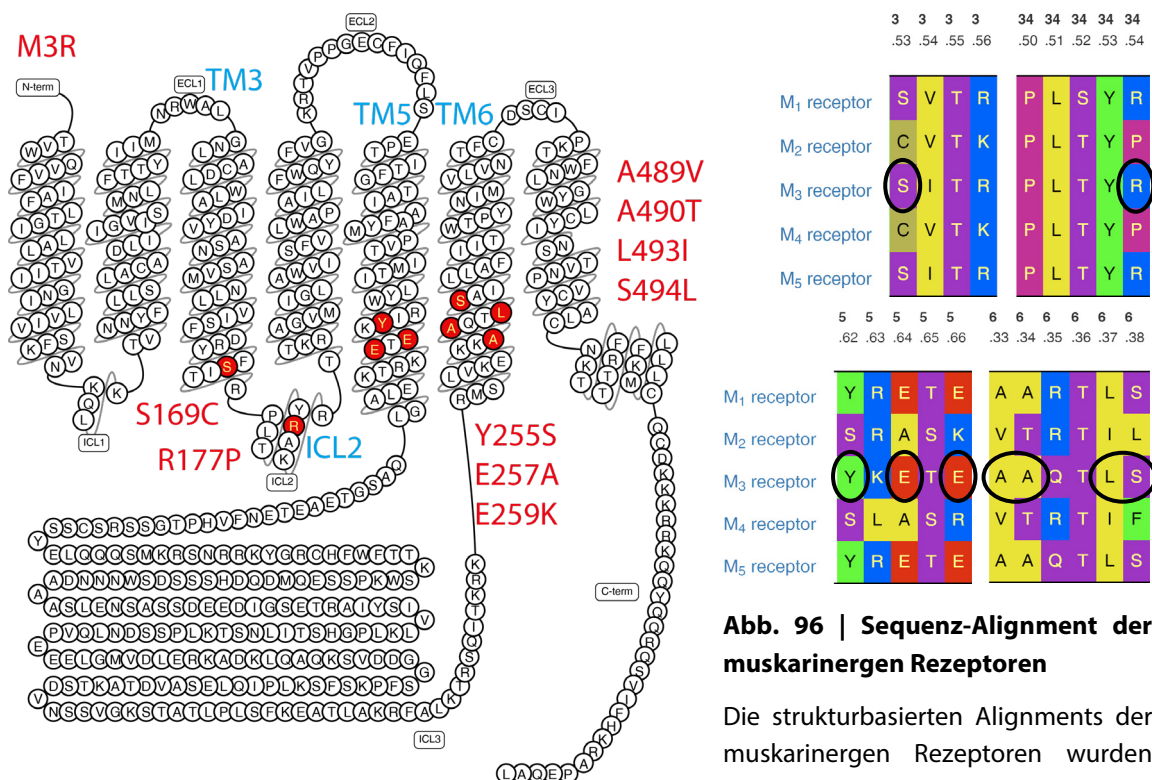


Abb. 96 | Sequenz-Alignment der muskarinergen Rezeptoren

Die strukturbasierten Alignments der muskarinergen Rezeptoren wurden der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen.

Abb. 95 | Punktmutationen im M₃R

Der Snake-Plot des M₃Rs wurde der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen.

Bindung von Go und Gq an M₃R-TM3/ICL2-Mutanten S169C / R177P

Im Vergleich zum M₃R-WT konnten die Mutationen in TM3 (S169C) und im ICL2 (R177P) des M₃Rs jedoch weder die Dissoziationskinetik von Gao verlangsamen (Abb. 97, links), noch die von Gq beschleunigen (Abb. 97, rechts). Die Bindungsstabilitäten G-Proteinen am Rezeptor wurden daher nicht durch die Mutationen beeinflusst.

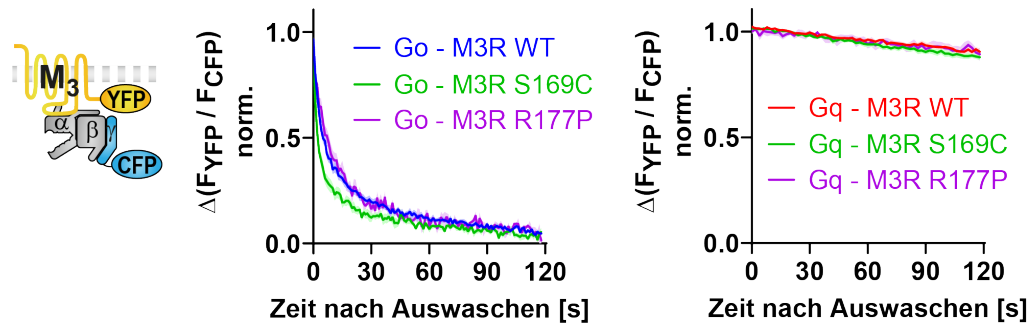


Abb. 97 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an M₃R-TM3 / ICL2-Mutanten

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M₃R-WT; n=16, M₃R-S169C; n=5, M₃R-R177P; n=4 von einem Messtag) (rechts: Gq mit M₃R-WT; n=11, M₃R-S169C; n=12, M₃R-R177P; n=4 von 1-2 unabhängigen Messtagen).

Bindung von Go und Gq an M₃R-TM5-Mutanten Y255S / E257A / E259K

Die M₃R-TM5-Mutanten E257A und E259K konnten die Bindungsstabilität von Go (Abb. 98, links) oder Gq (Abb. 98, Mitte) nicht verändern. Dagegen beeinträchtigte die Y255S-Mutation evtl. die Bindung zu Go anstatt sie zu verbessern, während die Bindung zu Gq wahrscheinlich komplett unterbunden wurde, da die Amplitude im Vergleich zum M₃R-WT sehr klein war (Abb. 98, rechts). Zur Bestätigung sollte allerdings noch überprüft werden, dass diese nicht höher ist als die Amplitude von endogenen G-Proteinen (mit pcDNA3 statt transfizierter Gα-UE). Blüml et al. (1994b) behaupteten jedoch schon frühzeitig, dass die Y255S-Mutation im M₃R den Gq-Signalweg hemmt.

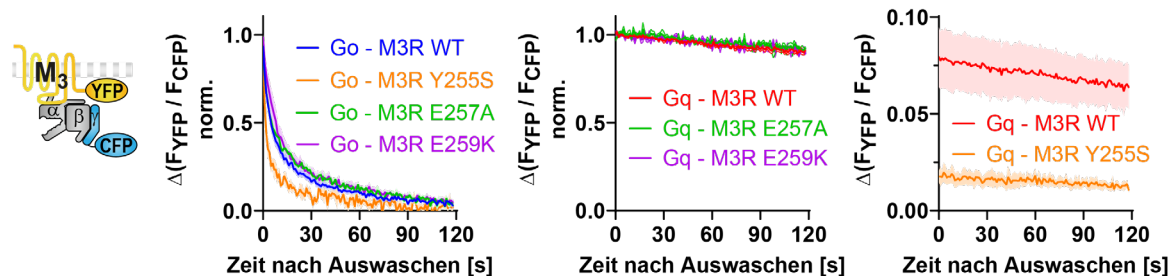


Abb. 98 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an M₃R-TM5-Mutanten

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M₃R-WT; n=17, M₃R-Y255S; n=5, M₃R-E257A; n=6, M₃R-E259K; n=10 von 1-2 unabhängigen Messtagen) (Mitte: Gq mit M₃R-WT; n=7, M₃R-E257A; n=3, M₃R-E259K; n=3 von einem Messtag). In der rechten Abb. wurden absolute Amplituden dargestellt (rechts: Gq mit M₃R-WT; n=3, M₃R-Y255S; n=3 von einem Messtag).

Bindung von Go und Gq an M₃R-TM6-Mutanten A489V / A490T / L493I / S494L

Blin et al. (1995) vermuteten an den Stellen A489, A490, L493 und S494 in der TM6 des M₃Rs das AALS-Motiv, das es einem mutierten M₂R (VTIL → AALS) ermöglichen sollte, Signalmoleküle des Gq-Signalwegs zu generieren. Diese Aminosäuren wurden daher ebenfalls in direkten Bindungsexperimenten untersucht. Die M₃R A489V-Mutante verlangsamte dabei als einzige leicht die Dissoziation von Gao vom Rezeptor (Abb. 99, links), jedoch schien sie auf die Bindungsstabilität von Gq keinen Einfluss zu haben (Abb. 99, rechts). Dies galt sogar für die 4-fach-Mutante des M₃Rs (AALS → VTIL), die die Bindung von Go und Gq nicht wesentlich beeinflusste.

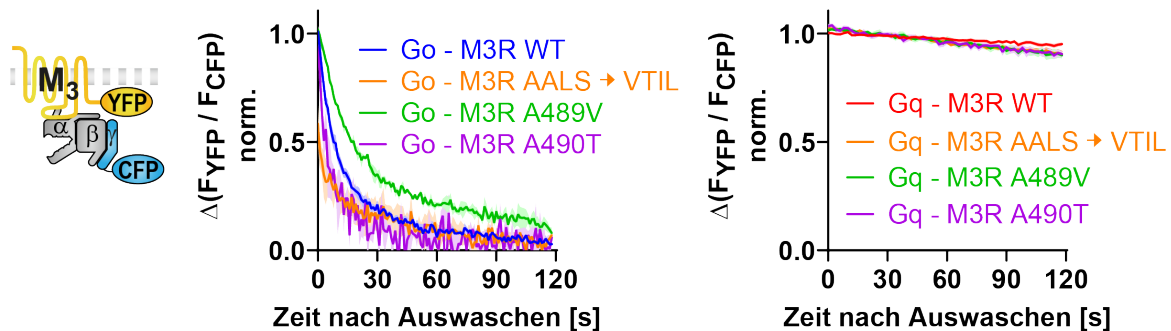


Abb. 99 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an M₃R-TM6-Mutanten

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M₃R-WT; n=7, M₃R-AALS→VTIL; n=3, M₃R-A489V n=3, M₃R-A490T; n=2 von einem Messtag) (rechts: Gq mit M₃R-WT; n=16, M₃R-AALS→VTIL; n=5, M₃R-A489V n=6, M₃R-A490T; n=7 von 1-2 unabhängigen Messtagen).

Dementsprechend zeigten auch die anderen beiden Einzelmutationen des M₃Rs L493I und S494L im Vergleich zum M₃R-WT keine nennenswert erhöhte Bindungsstabilität von Go (Abb. 100, links) oder reduzierte Stabilität von Gq (Abb. 100, rechts).

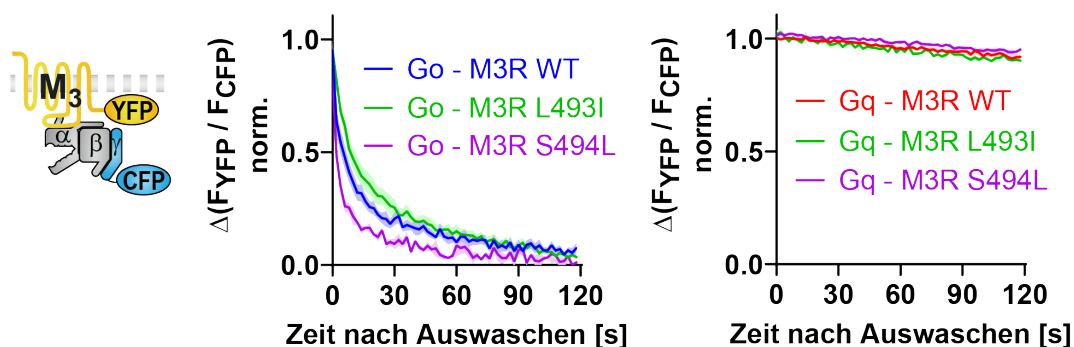


Abb. 100 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an M₃R-TM6-Mutanten

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M₃R-WT; n=5, M₃R-L493I n=5, M₃R-S494L; n=3 von einem Messtag) (rechts: Gq mit M₃R-WT; n=7, M₃R-L493I n=3, M₃R-S494L; n=4 von einem Messtag).

Fazit der Punktmutationen im M_3R

Insgesamt zeigen die Punktmutationen in TM3, ICL2, TM5 und TM6 des M_3R s in Bindungsexperimenten keine nennenswerte Verschiebung der Kopplungspräferenzen von Gq- zu Go-Proteinen, da deren Bindungsstabilitäten an den Rezeptormutanten im Vergleich zum Wildtyp- M_3R nicht maßgeblich verändert sind.

4.2.2 | Untersuchung von M_3R -Mutanten mit deletiertem ICL3 ($M_3\Delta ICL3$)

Da die Punktmutationen die G-Protein-Bindung kaum beeinflussten, wurde der M_3R noch stärker modifiziert, indem der ganze dritte intrazelluläre Loop (ICL3) herausgeschnitten wurde. Dadurch sollten Rückschlüsse auf seinen Einfluss auf die Kopplungseigenschaften gezogen werden, da er etwa ein Drittel des gesamten M_3R s ausmacht (Abb. 101), während er für den Gi/o-koppelnden μ -Opioid-Rezeptor z.B. nur aus fünf Aminosäuren besteht.

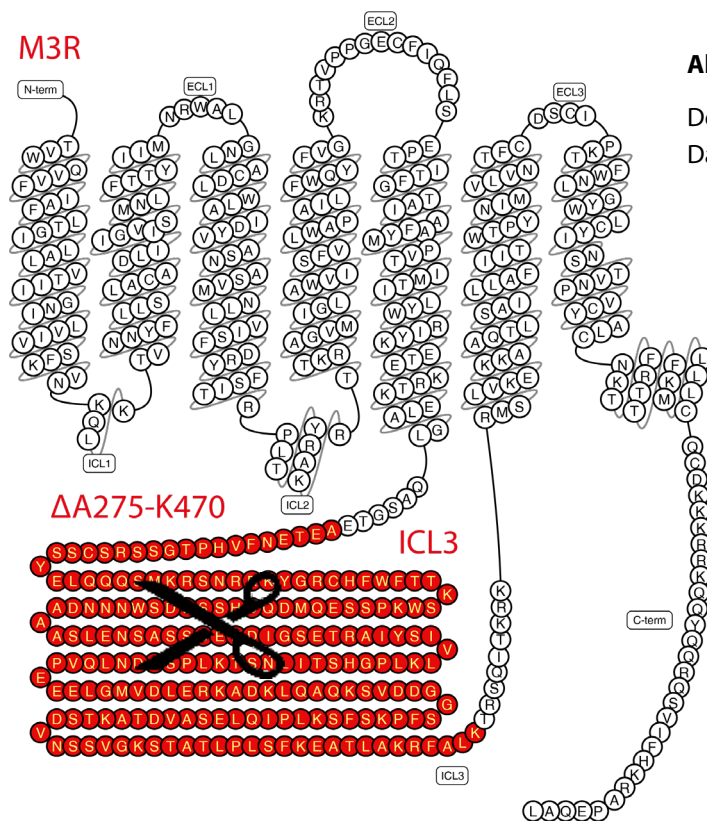


Abb. 101 | Deletion des ICL3 im M_3R

Der Snake-Plot des M_3R s wurde der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen.

Die große Deletion des ICL3 im M₃R zeigte im Vergleich zum M₃R WT jedoch keinen auffälligen Unterschied in der Bindungsstabilität von Go (Abb. 102, links) oder Gq (Abb. 102, rechts).

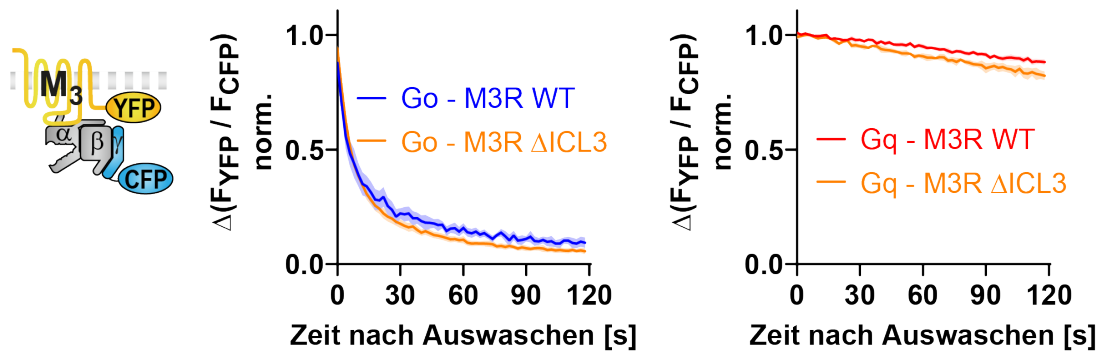


Abb. 102 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an M₃R mit deletiertem ICL3 (M₃R ΔICL3)

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M₃R-WT; n=6, M₃R-ΔICL3; n=8 von 2 unabhängigen Messtagen) (rechts: Gq mit M₃R-WT; n=6, M₃R-ΔICL3; n=4 von 2 unabhängigen Messtagen).

4.2.3 | Untersuchung chimärer M₃R mit ausgetauschtem ICL3 (M₃ICL3M₂)

Um die Untersuchung des ICL3 weiter in Richtung der transmembranären Helices auszudehnen, wurde ein chimärer M₃ICL3M₂-Rezeptor kloniert, dessen ICL3, einschließlich der angrenzenden Enden von TM5 und TM6, durch die entsprechenden Aminosäuren des M₂Rs ersetzt wurde (Abb. 103). Die unter 4.2.1 genannten Punktmutationen aus TM5 und TM6 sind daher in diesem chimären Abschnitt enthalten.

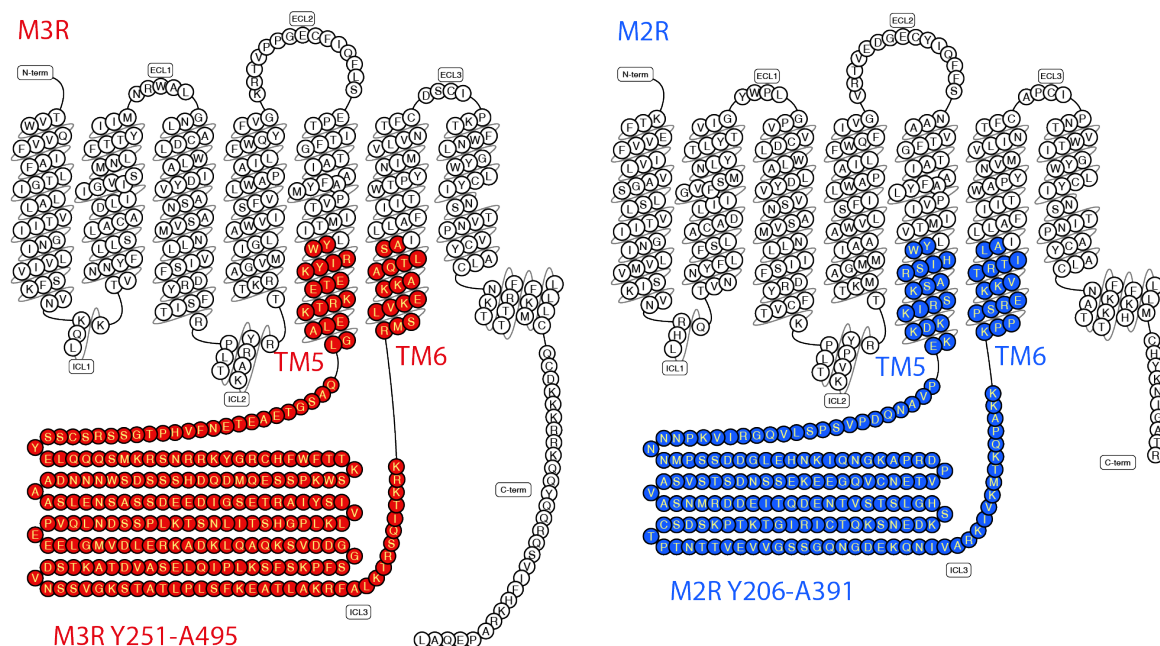


Abb. 103 | Chimärer Austausch des ICL3 im M₃R durch den vom M₂R (M₃ICL3M₂)

Die Snake-Plots des M₃Rs und M₂Rs wurden der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen.

Der chimäre Austausch des ICL3 inklusive der intrazellulären Abschnitte der TM5 und TM6 veränderte grundlegend die Kopplungseigenschaften des M_3R s, da die Bindungsstabilität von Gao am M_3ICL3M_2 -Rezeptor im Vergleich zum M_3R WT deutlich erhöht war (Abb. 104, links). Gleichzeitig verlor die Mutante allerdings auch die Fähigkeit Gq zu binden, da die kleinen Amplituden von Gq- M_3ICL3M_2 auf dem Niveau von endogen bindenden Gα-UE (pcDNA3 statt transfizierter Gα-UE) lagen (Abb. 104, rechts). Um sicherzustellen, dass der Verlust der Gq-Bindung nicht vom Serin an Position 255 ausgelöst wurde, welches als einzelne Punktmutation in der M_3R Y255S-Mutante schon die Bindung von Gαq beeinträchtigte (siehe Abb. 98, rechts), wurde dieses zu einem Tyrosin zurückmutiert (M_3ICL3M_2 S255Y), jedoch konnte trotzdem keine Bindung von Gq detektiert werden (Abb. 104, rechts).

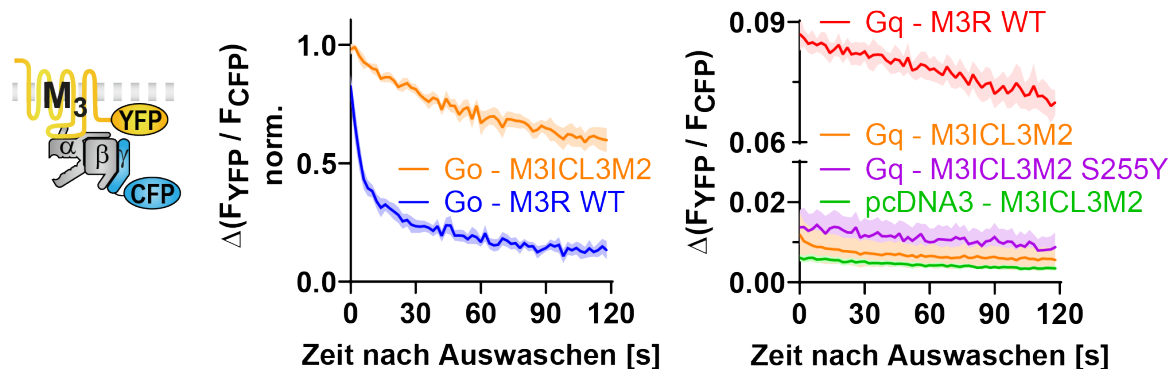


Abb. 104 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an den chimären M_3ICL3M_2 -Rezeptor

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M_3R -WT; $n=5$, M_3ICL3M_2 ; $n=5$ von 2 unabhängigen Messtagen). In der rechten Abb. wurden absolute Amplituden dargestellt (rechts: Gq mit M_3R -WT; $n=3$, M_3ICL3M_2 ; $n=4$, M_3ICL3M_2 S255Y; $n=3$ und pcDNA3 mit M_3ICL3M_2 ; $n=4$ von einem Messtag).

Fazit des M_3ICL3M_2 -Rezeptors

Durch die große Übertragung des ICL3 einschließlich der angrenzenden Aminosäuren von TM5 und TM6 vom M_2R auf den M_3R nähern sich die Kopplungspräferenzen des chimären M_3ICL3M_2 -Rezeptors tatsächlich denen des M_2R s an, der ebenfalls keine Gq-Proteine binden kann, während die Bindungsstabilität von Go im Vergleich zum M_3R sichtbar erhöht ist (siehe Abb. 107).

4.2.4 | Untersuchung chimärer M₃R und M₂R mit ausgetauschter Helix 8 (M₃H8M₂ / M₂H8M₃)

Auf der Suche nach weiteren Rezeptorstrukturen, die die Kopplungselektivität beeinflussen, zeigte die nah mit dem M₃R verwandte Struktur des M₁R-G11-Komplexes, dass sich der C-Terminus des Rezeptors entlang einer Furche zwischen der Gα-UE und Gβ-UE erstreckt, wo sich in den Gq-gekoppelten M₁R, M₃R und M₅R ein basisches Cluster befindet, welches im M₂R und M₄R nicht vorhanden ist (Maeda et al., 2020). Daher wurde die Helix 8 einschließlich des C-Terminus ebenfalls in Bindungsexperimenten anhand von M₃R- und M₂R-Chimären getestet, in denen dieser Abschnitt miteinander vertauscht war (Abb. 105).

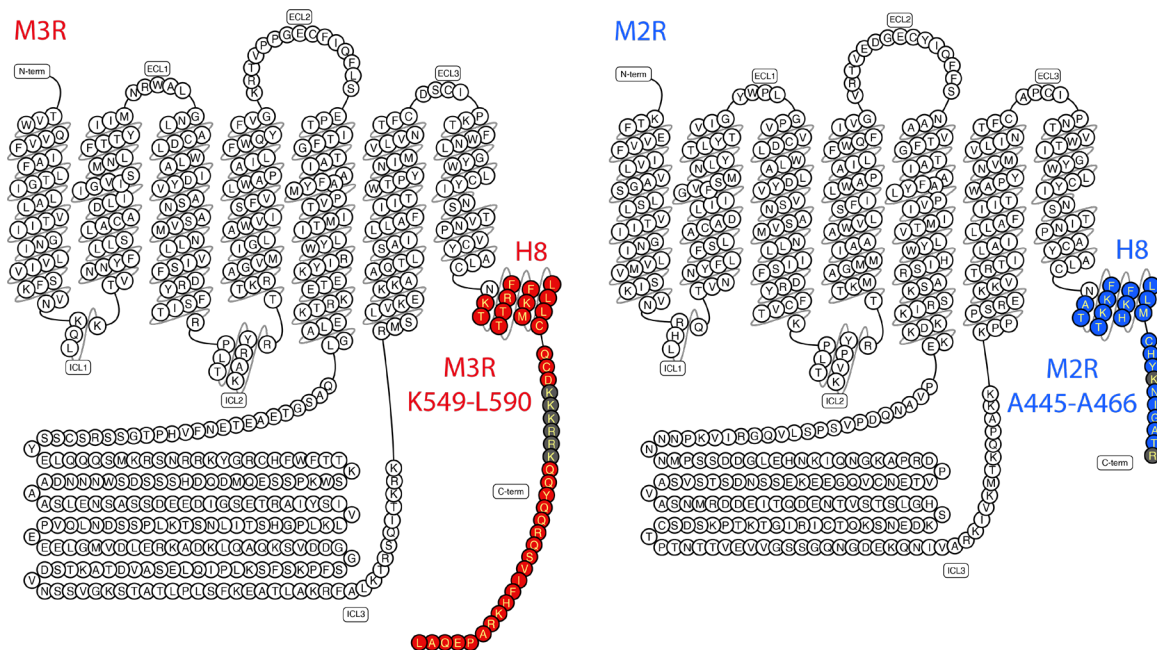


Abb. 105 | Chimärer Tausch der Helix 8 in M₃R durch den von M₂R (M₃H8M₂ / M₂H8M₃)

Die Snake-Plots des M₃Rs und M₂Rs wurden der GPCR-Datenbank (gpcrdb.org) entnommen. Aminosäuren des C-terminalen basischen Clusters wurden grau eingefärbt.

Bindung von Go und Gq an den chimären M₃H8M₂-Rezeptor

Zuerst wurde die M₃H8M₂-Chimäre untersucht, von der Gq etwas schneller dissoziierte (ca. 5%) als vom Wildtyp-M₃R (Abb. 106, links). Bemerkenswerterweise konnte Go jedoch nicht mehr an die M₃H8M₂-Chimäre binden, was durch kleine Amplituden auf dem Niveau von endogenen G-Proteinen (pcDNA3 statt transfizierter Gα-UE) dargestellt wurde (Abb. 106, rechts). Da Go jedoch problemlos an den M₃R als auch an den M₂R (Abb. 107, rechts) binden kann, war es unerwartet, dass die M₃H8M₂-Chimäre die Fähigkeit der Go-Kopplung verloren hatte.

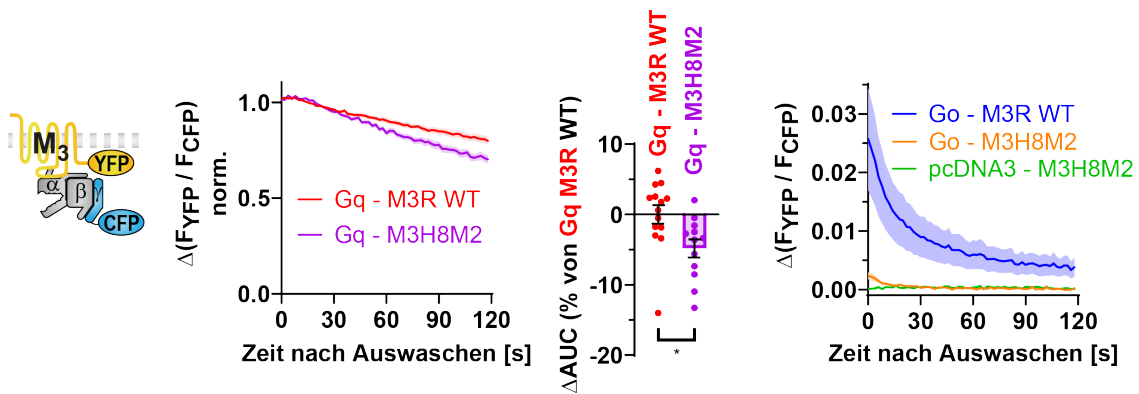


Abb. 106 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an den chimären M₃H8M₂-Rezeptor

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. Dissoziationskinetiken von M₃R-Gq-Komplexen wurden durch Bestimmung der AUC quantifiziert und in Relation (Δ AUC) zu Gq-M₃R-WT dargestellt. (links: Gq mit M₃R-WT; n=14 und M₃H8M₂; n=12 von 3 unabhängigen Messtagen). Zur statistischen Auswertung wurde ein einseitiger t-Test durchgeführt (*P < 0,05). In der rechten Abb. wurden absolute Amplituden dargestellt (rechts: Go mit M₃R-WT; n=6, M₃H8M₂; n=9 und pcDNA3 mit M₃H8M₂; n=4 von 1-3 unabhängigen Messtagen).

Bindung von Go und Gq an den chimären M₂H8M₃-Rezeptor

Die auf dem M₂R basierende M₂H8M₃-Chimäre zeigte in den G-Protein-Bindungsexperimenten ebenfalls bemerkenswerte Effekte, da Go deutlich stabiler an diese binden konnte als an den Wildtyp-M₂R. Darüber hinaus ermöglichte der Austausch dieser letzten 22 Aminosäuren im M₂R durch die AS des M₃Rs sogar Interaktionen mit Gq (Abb. 107, links), wohingegen Gq sonst nicht in der Lage ist an den M₂R WT zu koppeln, da die Amplitudenhöhe in der rechten Abb. 107 klar unter dem Niveau von endogenen G-Proteinen (pcDNA3 statt transfizierter Ga-UE) blieb.

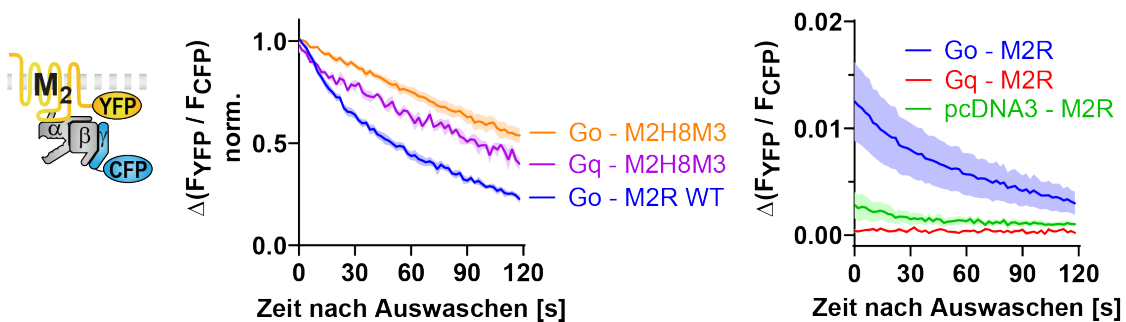


Abb. 107 | Stabilität der Bindung von Go und Gq an den chimären M₂H8M₃-Rezeptor

Die Bindungsexperimente wurden durchgeführt, wie unter (3.5, Abb. 38) beschrieben. (links: Go mit M₂R-WT; n=5, M₂H8M₃; n=6 und Gq mit M₂H8M₃; n=3 von einem Messtag). In der rechten Abb. wurden absolute Amplituden dargestellt (rechts: Go mit M₂R-WT; n=5, Gq mit M₂R-WT; n=11 und pcDNA3 mit M₂R-WT; n=13 von 1-3 unabhängigen Messtagen).

Insgesamt scheint die vom M₂R abstammende Helix 8 inklusive des C-Terminus daher die Bindung von Ga-UE unspezifisch zu beeinträchtigen, da sie im chimären M₃H8M₂ die Go- und im M₂R-WT die Gq-Bindung verhindert, während auch die Go-Bindung am M₂R verschlechtert ist.

Kapitel 5: Diskussion

Etwa 800 verschiedene G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (GPCRs) unseres Genoms binden vielfältige extrazelluläre Liganden wie Neurotransmitter oder Hormone, um spezifische Signale in Zellen hinein zu übertragen und dort gewünschte Reaktionen auszulösen. Da die Aktivierung spezifischer Signalwege in den Zellen davon abhängig ist, an welche der vier heterotrimeren G-Protein-Klassen ein GPCR bevorzugt koppelt, ist es von zentraler Bedeutung den Mechanismus der selektiven G-Protein-Erkennung und -Kopplung durch GPCRs zu verstehen. Aus diesem Grund wurden in dieser Arbeit verschiedene Proteinstrukturen in Rezeptoren und $G\alpha$ -Untereinheiten mittels Mutagenesestudien untersucht, um herauszufinden, wie sie die Kopplungsselektivität beeinflussen. Der muskarinerge M_3 -Rezeptor wurde als Modellsystem für G_q -gekoppelte Rezeptoren verwendet, da sich die Bindungsstabilität von G-Proteinen in M_3R -G-Protein-Komplexen gut messen lässt und er außerdem auch mit reduzierter Affinität an G_i/o -Proteine koppeln kann, wie zuvor von Ilyaskina et al. (2018) bestätigt wurde. Dadurch konnten die Kopplungseigenschaften von zwei verschiedenen G-Protein-Klassen am selben Rezeptor durch FRET-basierte Experimente direkt miteinander verglichen werden. Darüber hinaus wurde ein Großteil der Experimente auch mit dem histaminergen H_1 -Rezeptor reproduziert, der ähnliche Kopplungseigenschaften aufweist wie der M_3R , sodass die Ergebnisse auch mit einem zweiten G_q -gekoppelten Rezeptor überprüft werden konnten.

5.1 | FRET-Experimente

In G-Protein-Bindungsexperimenten wurden zuerst Dissoziationskinetiken von Rezeptor-G-Protein-Komplexen in permeabilisierten Zellen analysiert, um die Stabilität der Bindung von Nukleotid-freien $G\alpha$ -UE an Agonist-aktivierten Rezeptoren zu bestimmen. Das Auswerten von Kinetiken ermöglichte dabei sowohl die zeitliche Betrachtung der G-Protein-Interaktion am Rezeptor als auch deren Quantifizierung, um die Bindungsstabilität verschiedener G-Proteine bzw. G-Protein-Klassen am Rezeptor miteinander vergleichen zu können, was statische Interaktionen in GPCR-G-Protein-Komplex-Strukturen nicht leisten können. Zur Quantifizierung der Dissoziationskinetiken wurde die AUC, also die Fläche unter den Kurven, bestimmt, da dies die Analyse von verschiedenartigen Kurvenverläufen möglich machte. Das Fitten von exponentiellen Funktionen wäre dagegen nur für schnellere Kinetiken, jedoch nicht für die sehr langsamen und ziemlich linear verlaufenden

Kinetiken der Gq-Proteine möglich gewesen. Weiterhin musste sichergestellt werden, dass die Bindung von endogen exprimierten G α -UE keine unspezifischen FRET-Signale erzeugt. Daher wurden für Bindungspartner mit sehr geringem Signal- zu Rauschverhältnis auch absolute FRET-Amplituden gegen eine negative Kontrolle verglichen, für die ein leerer Vektor (pcDNA3) statt einer G α -UE transfiziert wurde. Falls ein bestimmter Rezeptor mit einer bestimmten G α -UE kein höheres FRET-Signal als das der endogenen Kontrolle zeigte, wurde angenommen, dass keine nennenswerte Bindung zwischen beiden Proteinen stattfand. Die Messung der Bindungsstabilität vom G-Protein am Rezeptor konnte jedoch frühestens den stabilen ternären Komplex erfassen, sodass potentielle vor der GDP-Freisetzung auftretende intermediäre Komplexe schon davor die G-Protein-Selektivität hätten beeinflussen können, wie von Du et al. (2019) vermutet wurde. Kato et al. (2019) bestimmten sogar eine intermediäre Struktur, in der die G α -UE im Vergleich zum stabilen ternären Komplex um 45° gedreht am Rezeptor bindet, was bestätigt, dass andersartige initiale Interaktionen auftreten können, die in unseren Experimenten nicht untersucht werden können.

Im zweiten Schritt wurde in FRET-basierten G-Protein-Aktivierungsmessungen untersucht, wie sich die Bindungsstabilitäten am Rezeptor letztlich auf die physiologisch relevante G-Protein-Aktivierung auswirken. Dafür wurden Konzentrations-Wirkungskurven ausgewertet, die abschließende Aussagen über den Einfluss von bestimmten G α -Strukturen auf die nachgeschaltete Signalweiterleitung erlaubten. Die G-Protein-Aktivierung wurde hierfür hauptsächlich indirekt gemessen, indem die Rekrutierung der GRK2 durch G $\beta\gamma$ -UE, die von aktivierten G α -UE dissoziiert waren, konzentrationsabhängig gemessen wurde. Die indirekte Methode schien dabei geeigneter zu sein als die direkte Messung der G-Protein-Aktivierung, weil diese mitten in die G α -UE eingefügte Fluorophore voraussetzt, die potenziell die Eigenschaften der G α -UE verändern. Da diese Insertionen in G α_q und in G α_o jeweils an verschiedenen Positionen erfolgten, sind die Aktivierungspotenzen zwischen den beiden G-Protein-Klassen (Gq und Go) mit der direkten Methode nicht zuverlässig miteinander vergleichbar. Diese Herausforderung besteht bei der indirekten Messung nicht, jedoch hat diese dafür den Nachteil, dass auch endogen exprimierte G α -UE aktiviert werden können, die unspezifische FRET-Signale erzeugen. Für jedes Experiment wurde daher zusätzlich die Aktivierung der endogenen G-Proteine gemessen, deren kleine Amplitude bei sättigender Agonist-Konzentration von den Amplituden aller ausgewerteten G α -Konstrukte signifikant überschritten wurde, sodass die Ergebnisse der indirekten Aktivierungsmessungen damit aussagekräftig waren.

Allerdings konnte eine teilweise Abflachung der Konzentrations-Wirkungskurven bei gleichzeitiger Linksverschiebung noch nicht experimentell erklärt werden. Um den vermuteten Einfluss von eventuell am Rezeptor konkurrierenden endogenen G-Proteinen zu überprüfen, könnte man zukünftig Experimente in Knockout-Zellen durchführen, die keine anderen endogenen G-Proteine mehr exprimieren als solche, die mit Inhibitoren wie Pertussis-Toxin inaktiviert werden können.

Insgesamt ermöglichte die Kombination der verschiedenen FRET-basierten Experimente, dass die sequentiellen Kopplungsereignisse zwischen GPCR und G-Protein an zwei verschiedenen Zeitpunkten differenziert voneinander untersucht werden konnten, die sich in ihrem Einfluss auf die Kopplungsselektivität teilweise unterschieden.

5.2 | Strukturelle Einflüsse auf die Kopplungsspezifität

Die FRET-Experimente wurden sowohl mit mutierten und chimären Rezeptoren als auch mit chimären G-Proteinen durchgeführt, sodass mehrere Strukturen in den beiden Kopplungspartnern identifiziert werden konnten, die essentiell für die selektive Bindung und Aktivierung der $G\alpha$ -UE durch Gq-gekoppelte Rezeptoren sind. Dafür wurden mit den modifizierten Rezeptoren zunächst nur G-Protein-Bindungsexperimente durchgeführt, um die Bindungsstabilität von $G\alpha_o$ und $G\alpha_q$ an den Rezeptormutanten abzuschätzen. Für die Untersuchung von chimären G-Proteinen wurde dann zusätzlich auch deren Aktivierung getrennt von der Bindung an den Rezeptor analysiert, um den jeweiligen Einfluss auf die selektive Signaltransduktion dieser $G\alpha$ -Chimären durch M_3 - und H_1 -Rezeptoren zu untersuchen.

5.2.1 | Einfluss von GPCR-Strukturen auf die Kopplungsspezifität

Die im zweiten Ergebnisteil (unter 4.2) dargestellten FRET-Experimente dienten anfangs dazu, Strukturen im M_3 -Rezeptor zu identifizieren, die die selektive Bindung von $G\alpha_o$ - und $G\alpha_q$ -Proteinen beeinflussen. Erste Punktmutationen im M_3R offenbarten jedoch kaum neue Erkenntnisse. Einzig die M_3R -Y255S-Mutante beeinträchtigt die Gq-Kopplung in Übereinstimmung mit der Studie von Blüml et al. (1994a), nach der eine aromatische Aminosäure an Position 255 benötigt wird, um den Gq-Signalweg zu aktivieren. Vermutungen von Blin et al. (1995), dass die N- und C-terminalen Abschnitte des ICL3 bis in die transmembranären Helices TM5 und TM6 hinein für die Kopplungsselektivität verantwortlich seien, konnten durch die Mutationen des AALS-Motivs, das in der TM6 des M_3R s gegen das VTIL-Motiv des M_2R s ausgetauscht wurde, vorerst nicht bestätigt werden. Für

diese Rezeptormutanten sollte allerdings zukünftig noch die nachgeschaltete G-Protein-Aktivierung untersucht werden, da die Mutationen die Kopplungsselektivität auch später, während der G-Protein-Aktivierung, beeinflussen könnten, wie schon für einige chimäre G α -UE im ersten Ergebnisteil (unter 4.1) dieser Arbeit gezeigt werden konnte.

Weiterhin wurde der große dritte intrazelluläre Loop (ICL3) des M $_3$ R untersucht, dessen Funktion bisher weitgehend unbekannt ist, weil er aufgrund seiner Flexibilität noch nicht in seiner dreidimensionalen Struktur aufgelöst werden konnte. Da er jedoch ein Drittel des ganzen M $_3$ R ausmacht, während er beispielsweise im Gi/o-koppelnden μ -Opioid-Rezeptor nur aus fünf Aminosäuren besteht, wurde er mit der Erwartung herausgeschnitten, die Kopplungseigenschaften des M $_3$ R stärker zu beeinflussen. Die Ergebnisse der Bindungsexperimente zeigten jedoch, dass die Deletion des ICL3 die Bindungsstabilitäten von Go- und Gq-Proteinen am Rezeptor ebenfalls nicht verändert.

Im Gegensatz dazu führt der Austausch des ICL3 einschließlich der intrazellulären Enden von TM5 und TM6 im M $_3$ R durch die entsprechenden Aminosäuren des verwandten Gi/o-koppelnden M $_2$ R zu einer deutlich stabileren Bindung von Gao. Diese ist am M $_3$ ICL3M $_2$ -Rezeptor sogar noch stabiler als am M $_2$ R, sodass man spekulieren kann, dass sich die Affinitäts-generierenden Interaktionen zwischen Gao und dem M $_3$ - bzw. M $_2$ -Rezeptor in der M $_3$ ICL3M $_2$ -Chimäre addieren. Dagegen kann dieser chimäre Rezeptor keine Gq-Proteine mehr binden, sodass sich die Kopplungseigenschaften dem M $_2$ R annähern. Die Fähigkeit Gq zu binden kann auch nicht durch die Erfüllung der von Blüml et al. (1994a) vermuteten Voraussetzung einer aromatischen Aminosäure an Position 255 wiederhergestellt werden, denn die Rückmutation der aus dem M $_2$ R stammenden Aminosäure an Position 255 zum aromatischen Tyrosin in der M $_3$ ICL3M $_2$ -S255Y-Mutante lässt weiterhin keine Bindung von Gq zu. Insgesamt ist durch den sehr großen chimären Austausch jedoch noch nicht eindeutig geklärt, welche Aminosäureabschnitte am meisten zur veränderten Kopplungsspezifität beitragen. Weiterhin wäre auch noch die Untersuchung des umgekehrten chimären Austauschs in einem M $_2$ R-basierten M $_2$ ICL3M $_3$ -Rezeptor interessant, was zukünftig für noch aussagekräftigere Erkenntnisse über den ICL3 sorgen könnte.

Als letzte Rezeptorstruktur wurde die Helix 8 einschließlich des C-Terminus bezüglich ihres Einflusses auf die Selektivität der G-Protein-Bindung untersucht, indem neue Rezeptor-Chimären kloniert wurden, in denen diese Struktur zwischen M $_3$ R und M $_2$ R vertauscht wurde. Dabei zeigten

die Bindungsexperimente, dass Gao nicht mehr mit M₃R-basierten M₃H8M₂-Chimären interagieren kann. Bemerkenswerterweise ermöglicht dagegen die vom M₃R abstammende Helix 8 in der umgekehrten M₂R-basierten M₂H8M₃-Chimäre die Bindung von Gq, die mit dem Wildtyp-M₂R nicht möglich ist. Insgesamt scheinen die letzten Aminosäuren ab der Helix 8 vom M₂R also die Interaktionen mit Gα-UE unspezifisch zu beeinträchtigen, da im chimären M₃H8M₂ die Go- und im M₂R-WT die Gq-Bindung verhindert wird. Go interagiert zwar trotzdem schwach mit dem M₂R-WT, jedoch ist die Bindungsstabilität am M₂H8M₃-Rezeptor durch die Aminosäuren des M₃R noch weiter erhöht bzw. weniger gestört als mit der ursprünglichen M₂R-Struktur. Daher scheint die Helix 8 einschließlich des C-Terminus eine zentrale Rolle für die selektive Bindung von G-Proteinen zu spielen.

5.2.2 | Einfluss von G-Protein-Strukturen auf die Kopplungsspezifität

Da sich die Aminosäuren, die die G-Protein-Bindung am Rezeptor beeinflussen, aufgrund der großen intrazelluläre Bindetasche, die sich aus vielen einzelnen Strukturen (7 transmembranäre Helices und 3 ICLs) zusammensetzt, schwierig eingrenzen ließen, wurde die Erforschung weiterer Strukturen auf die gegenüberliegende Seite der G-Proteine verlagert, für deren detaillierte Analyse zusätzlich auch die G-Protein-Aktivierung untersucht wurde. Da diese Ergebnisse den Hauptteil dieser Arbeit ausmachen und auch statistisch verwertbar sind, wurden sie schon im ersten Ergebnisteil dieser Arbeit (unter 4.1) behandelt. Der Vergleich von Gα-Chimären mit den jeweiligen Gα-Wildtyp-UE, von denen sie abstammen, offenbarte dort, dass M₃-Rezeptoren unter Nukleotid-freien Bedingungen sowohl Go- als auch Gq-basierte Chimären unverändert binden können, bei denen jeweils die letzten 11 Aminosäuren des C-Terminus durch die Aminosäuren der anderen G-Protein-Klasse ersetzt wurden (GoqC11 / GqoC11). Diese Erkenntnisse vervollständigen die Ergebnisse einer früheren Studie von (Okashah et al., 2019), nach der einige Rezeptoren Gα-UE unabhängig von deren äußeren C-Termini binden können, zusätzlich mit kinetischen Daten. Im Gegensatz zum M₃R ist die Bindung von GoqC11 am H₁R etwas stabiler als die von Go, während GqoC11 im Vergleich zu Gq deutlich an Stabilität zum H₁R verliert. Dieser Rezeptor-spezifische Unterschied ist wegen der besonders großen Kontaktfläche, die intrazellulär zwischen den transmembranären Helices und dem exponierten C-Terminus der Gα-UE besteht, nicht ungewöhnlich. Unsere Experimente deuten jedoch darauf hin, dass der äußerste Gα-C-Terminus dann spätestens für die Selektivität der nachgeschalteten G-Protein-Aktivierung durch den M₃R

eine wichtige Rolle spielt, da die Konzentrations-Wirkungskurven von GoqC11 und GqoC11 im Vergleich zu Go oder Gq jeweils erheblich verschoben sind, auch wenn die reine Bindung an den M₃R im Wesentlichen unverändert bleibt. Dieser Einfluss auf die nachgeschaltete Signaltransduktion steht im Einklang mit älteren funktionellen Studien, die behaupten, dass die Akkumulation von später generierten Signalmolekülen (*Second-Messengern*) von der distalen C-terminalen $\alpha 5$ -Helix abhängig ist (Conklin et al., 1993; Kostenis, Gomeza, et al., 1997). Insgesamt zeigen unsere Bindungs- und Aktivierungsexperimente für den M₃R daher, dass die Kopplungsspezifität gegenüber den 11 äußersten C-terminalen Aminosäuren der G α -UE erst eingreift, nachdem die Bindung an den Rezeptor schon stattgefunden hat. Da dies vermutlich Rezeptor-abhängig ist, besteht jedoch der Bedarf noch weitere GPCRs zu untersuchen.

Der Austausch der ganzen 22 Aminosäuren langen $\alpha 5$ -Helix verbessert hingegen schon initial die Bindungsstabilität von GoqC22-Konstrukten an beiden Rezeptoren, was nachfolgend auch in höheren Aktivierungspotenzen resultiert. Im umgekehrten Fall binden GqoC22-Chimären jedoch vermutlich nicht mehr an M₃- oder H₁-Rezeptoren und können daher auch nicht von diesen aktiviert werden. Für eine abschließende Aussage sollte jedoch noch überprüft werden, dass nicht eine gestörte Expression der GqoC22-Konstrukte in den Zellen der Grund für die fehlenden spezifischen FRET-Signale ist. Insgesamt konnte unseres Wissens nach zum ersten Mal experimentell bestätigt werden, dass vor allem der N-terminale Teil der $\alpha 5$ -Helix eine zentrale Rolle für die Bindung und Aktivierung durch Gq-gekoppelte Rezeptoren spielt.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit demonstriert, dass der N-Terminus der G α -UE (einschließlich des $\alpha N/\beta 1$ -Loops) und der $\beta 2/\beta 3$ -Loop wichtige Funktionen für die selektive Kopplung ausüben. Zusammen mit der N-terminalen $\alpha 5$ -Helix bilden sie in der G α -Struktur eine Vertiefung, in die der ICL2 des Rezeptors binden kann (Du et al., 2019; Kim et al., 2020; Maeda et al., 2019). Unsere Experimente zeigen, dass die daraus resultierenden Interaktionen nicht nur für die grundlegende Bindung, sondern auch für die Kopplungsspezifität essentiell sind, da die hochaffinen Bindungseigenschaften durch den N-Terminus (in GoqN) und den $\beta 2/\beta 3$ -Loop (in Goq2) von G α q auf Go-basierte Chimären übertragen werden können und nachfolgend auch zur verbesserten G-Protein-Aktivierung durch beide Rezeptoren führen.

Im Gegensatz dazu sind jedoch die entsprechenden Strukturen von G α o in Gq-basierten Chimären wie GqoN und Gqo2 nicht in der Lage, die hochaffinen Bindungseigenschaften am M₃-Rezeptor zu stören. Erst die nachgeschaltete G-Protein-Aktivierung ist zumindest für

GqoN-Konstrukte beeinträchtigt. Dies legt nahe, dass der gesamte Kopplungsprozess, von der Bindung an den M₃R bis zur Rezeptor-induzierten G-Protein-Aktivierung, aus mehreren Schritten besteht, die sich in ihren Eigenschaften als Selektivitätsfilter unterscheiden. Für Gqo2 bleiben die Gq-artigen Eigenschaften dagegen auch für die Aktivierung durch den M₃R und H₁R erhalten. An den H₁R kann GqoN jedoch im Gegensatz zum M₃R schon initial nicht mehr binden. Dass Gao mit demselben N-Terminus wie GqoN wiederum problemlos an den H₁R koppelt, lässt darauf schließen, dass unterschiedliche Bindungsmodi am Rezeptor erzielt werden können, die vom jeweiligen Grundgerüst der G α -UE abhängen. Diese Vermutung steht im Einklang mit einer aktuellen Studie, die einen primären Kopplungsmodus mit G-Proteinen der bevorzugten G α -Unterfamilie und einen sekundären Kopplungsmodus für Interaktionen mit fremden G-Proteinen vorschlägt (Kim et al., 2020). Da der chimäre Austausch des N-Terminus oder des β 2/ β 3-Loops in Kombination mit der C-terminalen Helix von Gaq in Goq-Doppelchimären überadditiv hohe Bindungsstabilitäten an beiden Rezeptoren zeigt und diese Chimären daher teilweise Gq-ähnliche Eigenschaften erreichen, kann man vermuten, dass sie von einem Go-artigen zu einem Gq-artigen Kopplungsmodus wechseln, der zu zusätzlichen und stärkeren Interaktionen mit dem Rezeptor führt. Dagegen scheinen Gqo-Chimären zumindest einen ursprünglichen Gq-artigen Bindungsmodus mit dem M₃R beizubehalten, bis sie schließlich aktiviert werden.

Der α 4/ β 6-Loop, der laut anderen Studien ebenfalls mit dem Rezeptor interagieren kann (Oldham & Hamm, 2008; Preininger et al., 2013), hatte in unseren Experimenten hingegen keinen Einfluss auf die Bindungs- oder Aktivierungseigenschaften.

5.3 | Schlussfolgerung

Insgesamt konnten noch nicht für alle mutierten Rezeptoren abschließende Aussagen getroffen werden, da bislang nur die Bindung von G-Proteinen, aber nicht deren Aktivierung durch diese Rezeptoren untersucht wurde. Die AALS \rightarrow VTIL Mutation in TM6 des M₃Rs, die die Bindungsstabilität von Gao und Gaq nicht beeinflusste, könnte z.B. erst den nachgeschalteten Signalweg beeinträchtigen, worauf die Literatur hindeutet (siehe 5.2.1). Einige chimäre M₃-Rezeptoren lieferten jedoch auch schon in den präliminären Bindungsexperimenten deutliche Anhaltspunkte, welche Rezeptorstrukturen essentiell die G-Protein-Selektivität beeinflussen. Unter anderem konnte der vom M₂R stammende ICL3 einschließlich der angrenzenden Enden von TM5 und TM6

die M₂R-artigen Kopplungseigenschaften teilweise auf den chimären M₃ICL3M₂-Rezeptor übertragen, sodass diese Struktur zumindest als selektivitätsbestimmend für die Bindung von G-Proteinen angesehen werden kann. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass sich die Helix 8 einschließlich des Rezeptor-C-Terminus entscheidend auf die Fähigkeit auswirkt, ob bestimmte G-Protein-Klassen gebunden werden können oder deren Bindung verhindert wird, je nachdem von welchem Rezeptor sie abstammt.

Für die Gα-Chimären lässt sich zusammengefasst sagen, dass sie zum ersten Mal getrennt in Bezug auf ihre Eigenschaften untersucht wurden, selektiv durch zwei verschiedene Gq-gekoppelte Rezeptoren gebunden und aktiviert zu werden. Dabei wurden Gα-Strukturen wie der N-Terminus (einschließlich des αN/β1-Loops), zusammen mit dem β2/β3-Loop und den N- und C-terminalen Abschnitten der α5-Helix (für deren Lokalisation, siehe *Abb. 53*, *Abb. 54*, *Abb. 55*), identifiziert, essentielle Funktionen für die Kopplungsselektivität auszuüben. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass alle auf dem Go-Grundgerüst basierenden Gα-Chimären schon durch die Bindung an den M₃R und H₁R selektiert werden. Dagegen werden einige Gq-basierte Chimären, die die C-terminale α5-Helix von Gao (GqoC11) oder den N-Terminus von Gao (GqoN) enthalten, erst während der nachgeschalteten Aktivierung durch den M₃R selektiert, wohingegen der H₁R diese schon wie die Go-Chimären während der Bindung selektiert.

Insgesamt vermuten wir daher, dass Selektivitätsmechanismen nicht nur für jeden Rezeptor feingetunt sind, sondern auch an verschiedenen Zeitpunkten während eines mehrstufigen Kopplungsprozesses auftreten können. In der Zukunft wäre es daher sinnvoll, auch GPCRs mit anderen Kopplungsprofilen zu untersuchen, um die Erkenntnisse dieser Arbeit mehr zu einem generellen Mechanismus zu erweitern.

Literaturverzeichnis

- Alig, J., Marger, L., Mesirca, P., Ehmke, H., Mangoni, M. E., & Isbrandt, D. (2009). Control of heart rate by cAMP sensitivity of HCN channels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(29), 12189–12194. <https://doi.org/10.1073/pnas.0810332106>
- Bizzi, M. F., Bolger, G. B., Korbonits, M., & Ribeiro-Oliveira, A. (2019). Phosphodiesterases and cAMP pathway in pituitary diseases. *Frontiers in Endocrinology*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00141>
- Bjarnadóttir, T. K., Gloriam, D. E., Hellstrand, S. H., Kristiansson, H., Fredriksson, R., & Schiöth, H. B. (2006). Comprehensive repertoire and phylogenetic analysis of the G protein-coupled receptors in human and mouse. *Genomics*, 88(3), 263–273. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2006.04.001>
- Blahos, J., Fischer, T., Brabet, I., Stauffer, D., Rovelli, G., Bockaert, J., & Pin, J. P. (2001). A Novel Site on the G α -protein That Recognizes Heptahelical Receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 276(5), 3262–3269. <https://doi.org/10.1074/jbc.M004880200>
- Blin, N., Yun, J., & Wess, J. (1995). Mapping of single amino acid residues required for selective activation of Gq/11 by the M3 muscarinic acetylcholine receptor. In *The Journal of biological chemistry* (Vol. 270, Issue 30, pp. 17741–17748).
- Blüml, K., Mutschler, E., & Wess, J. (1994a). Functional role of a cytoplasmic aromatic amino acid in muscarinic receptor-mediated activation of phospholipase C. *Journal of Biological Chemistry*, 269(15), 11537–11541.
- Blüml, K., Mutschler, E., & Wess, J. (1994b). Identification of an intracellular tyrosine residue critical for muscarinic receptor-mediated stimulation of phosphatidylinositol hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry*, 269(1), 402–405.
- Bünemann, M., Frank, M., & Lohse, M. J. (2003). Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(26), 16077–16082. <https://doi.org/10.1073/pnas.2536719100>
- Campbell, A. P., & Smrcka, A. V. (2018). Targeting G protein-coupled receptor signalling by blocking G proteins. *Nature Reviews Drug Discovery*, 17(11), 789–803. <https://doi.org/10.1038/nrd.2018.135>

- Congreve, M., de Graaf, C., Swain, N. A., & Tate, C. G. (2020). Impact of GPCR Structures on Drug Discovery. *Cell*, 181(1), 81–91. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.003>
- Conklin, B. R., Farfel, Z., Lustig, K. D., Julius, D., & Bourne, H. R. (1993). Substitution of three amino acids switches receptor specificity of Gq α to that of Gi α . *Nature*, 363(6426), 274–276. <https://doi.org/10.1038/363274a0>
- Dror, R. O., Mildorf, T. J., Hilger, D., Manglik, A., Borhani, D. W., Arlow, D. H., Philippsen, A., Villanueva, N., Yang, Z., Lerch, M. T., Hubbell, W. L., Kobilka, B. K., Sunahara, R. K., & Shaw, D. E. (2015). Structural basis for nucleotide exchange in heterotrimeric G proteins. *Science*, 348(6241), 1361–1365. <https://doi.org/10.1126/science.aaa5264>
- Du, Y., Duc, N. M., Rasmussen, S. G. F., Hilger, D., Kubiak, X., Wang, L., Bohon, J., Kim, H. R., Wegrecki, M., Asuru, A., Jeong, K. M., Lee, J., Chance, M. R., Lodowski, D. T., Kobilka, B. K., & Chung, K. Y. (2019). Assembly of a GPCR-G Protein Complex. *Cell*, 177(5), 1232–1242.e11. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.022>
- Flock, T., Hauser, A. S., Lund, N., Gloriam, D. E., Balaji, S., & Babu, M. M. (2017). Selectivity determinants of GPCR-G-protein binding. *Nature*, 545(7654), 317–322. <https://doi.org/10.1038/nature22070>
- Förster, T. (1946). Energiewanderung und Fluoreszenz. *Die Naturwissenschaften*, 33, 166–175.
- Frank, M., Thümer, L., Lohse, M. J., & Bünemann, M. (2005). G protein activation without subunit dissociation depends on a Gai-specific region. *Journal of Biological Chemistry*, 280(26), 24584–24590. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414630200>
- Gibson, D. G., Young, L., Chuang, R. Y., Venter, J. C., Hutchison, C. A., & Smith, H. O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nature Methods*, 6(5), 343–345. <https://doi.org/10.1038/nmeth.1318>
- Glaaser, I. W., & Slesinger, P. A. (2015). Structural Insights into GIRK Channel Function. In *International Review of Neurobiology* (1st ed., Vol. 123). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.irn.2015.05.014>
- Grundmann, M., Merten, N., Malfacini, D., Inoue, A., Preis, P., Simon, K., Rüttiger, N., Ziegler, N., Benkel, T., Schmitt, N. K., Ishida, S., Müller, I., Reher, R., Kawakami, K., Inoue, A., Rick, U., Köhl, T., Imhof, D., Aoki, J., ... Kostenis, E. (2018). Lack of beta-arrestin signaling in the absence of active G proteins. *Nature Communications*, 9(1), 1–7. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02661-3>

- Harvey, R. D., & Belevych, A. E. (2003). Muscarinic regulation of cardiac ion channels. *British Journal of Pharmacology*, 139(6), 1074–1084. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705338>
- Hauser, A. S., Attwood, M. M., Rask-andersen, M., Schiöth, H. B., & Gloriam, D. E. (2017). Trends in GPCR drug discovery: new agents, targets and indications. *Nature Publishing Group*, 16(12), 829–842. <https://doi.org/10.1038/nrd.2017.178>
- Hilger, D., Kumar, K. K., Hu, H., Pedersen, M. F., O'Brien, E. S., Christine, L. G. J., Eskici, G., Inoue, A., Lerch, M., Mathiesen, J. M., Skiniotis, G., & Kobilka, B. K. (2020). Structural Insights Into Differences in G Protein Activation By Family A and Family B GPCRs. *Science*, 523(July). <https://doi.org/10.1126/science.aba3373>
- Hillenbrand, M., Schori, C., Schöppe, J., & Plückthun, A. (2015). Comprehensive analysis of heterotrimeric G-protein complex diversity and their interactions with GPCRs in solution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(11), E1181–E1190. <https://doi.org/10.1073/pnas.1417573112>
- Hoffmann, C., Nuber, S., Zabel, U., Ziegler, N., Winkler, C., Hein, P., Berlot, C. H., Bunemann, M., & Lohse, M. J. (2012). Comparison of the Activation Kinetics of the M3 Acetylcholine Receptor and a Constitutively Active Mutant Receptor in Living Cells. *Molecular Pharmacology*, 82(2), 236–245. <https://doi.org/10.1124/mol.112.077578>
- Hughes, T. E., Zhang, H., Logothetis, D. E., & Berlot, C. H. (2001). Visualization of a Functional Gαq-Green Fluorescent Protein Fusion in Living Cells. Association with the plasma membrane is disrupted by mutational activation and by elimination of palmitoylation sites, but not by activation mediated by receptors or AlF₄⁻. *Journal of Biological Chemistry*, 276(6), 4227–4235. <https://doi.org/10.1074/jbc.M007608200>
- Ilyaskina, O. S., Lemoine, H., & Bunemann, M. (2018). Lifetime of muscarinic receptor–G-protein complexes determines coupling efficiency and G-protein subtype selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115(19), 5016–5021. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715751115>
- Inoue, A., Raimondi, F., Kadji, F. M. N., Singh, G., Kishi, T., Uwamizu, A., Ono, Y., Shinjo, Y., Ishida, S., Arang, N., Kawakami, K., Gutkind, J. S., Aoki, J., & Russell, R. B. (2019). Illuminating G-Protein-Coupling Selectivity of GPCRs. *Cell*, 177(7), 1933–1947.e25. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.04.044>
- Johnston, C. A., & Siderovski, D. P. (2007). Receptor-mediated activation of heterotrimeric G-

- proteins: Current structural insights. *Molecular Pharmacology*, 72(2), 219–230. <https://doi.org/10.1124/mol.107.034348>
- Kato, H. E., Zhang, Y., Hu, H., Suomivuori, C. M., Kadji, F. M. N., Aoki, J., Krishna Kumar, K., Fonseca, R., Hilger, D., Huang, W., Latorraca, N. R., Inoue, A., Dror, R. O., Kobilka, B. K., & Skinotis, G. (2019). Conformational transitions of a neurotensin receptor 1–Gi1 complex. *Nature*, 572(7767), 80–85. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1337-6>
- Kim, H. R., Xu, J., Maeda, S., Duc, N. M., Ahn, D., Du, Y., & Chung, K. Y. (2020). Structural mechanism underlying primary and secondary coupling between GPCRs and the Gi/o family. *Nature Communications*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-16975-2>
- Kobilka, B. K. (2011). Structural insights into adrenergic receptor function and pharmacology. *Trends in Pharmacological Sciences*, 32(4), 213–218. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2011.02.005>
- Kostenis, E., Degtyarev, M. Y., Conklin, B. R., & Wess, J. (1997). The N-terminal extension of Ga(q) is critical for constraining the selectivity of receptor coupling. *Journal of Biological Chemistry*, 272(31), 19107–19110. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.31.19107>
- Kostenis, E., Gomeza, J., Lerche, C., & Wess, J. (1997). Genetic analysis of receptor-Ga(q) coupling selectivity. *Journal of Biological Chemistry*, 272(38), 23675–23681. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.38.23675>
- Kozasa, T., Hajicek, N., Chow, C. R., & Suzuki, N. (2011). Signalling mechanisms of RhoGTPase regulation by the heterotrimeric G proteins G12 and G13. *Journal of Biochemistry*, 150(4), 357–369. <https://doi.org/10.1093/jb/mvr105>
- Kruse, A. C., Kobilka, B. K., Gautam, D., Sexton, P. M., Christopoulos, A., & Wess, J. (2014). Muscarinic acetylcholine receptors: Novel opportunities for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 13(7), 549–560. <https://doi.org/10.1038/nrd4295>
- Lutz, S., Freichel-Blomquist, A., Yang, Y., Rümenapp, U., Jakobs, K. H., Schmidt, M., & Wieland, T. (2005). The guanine nucleotide exchange factor p63RhoGEF, a specific link between Gq/11-coupled receptor signaling and RhoA. *Journal of Biological Chemistry*, 280(12), 11134–11139. <https://doi.org/10.1074/jbc.M411322200>
- Maeda, S., Qu, Q., Robertson, M. J., Skinotis, G., & Kobilka, B. K. (2019). Structures of the M1 and M2 muscarinic acetylcholine receptor/G-protein complexes. *Science*, 364(6440), 552–557. <https://doi.org/10.1126/science.aaw5188>
- Maeda, S., Xu, J., Kadji, F. M. N., Clark, M. J., Zhao, J., Tsutsumi, N., Aoki, J., Sunahara, R. K., Inoue,

- A., Garcia, K. C., & Kobilka, B. K. (2020). Structure and selectivity engineering of the M1 muscarinic receptor toxin complex. *Science*, 7(July), 161–167.
- Mizuno, N., & Itoh, H. (2009). Functions and regulatory mechanisms of Gq-signaling pathways. *NeuroSignals*, 17(1), 42–54. <https://doi.org/10.1159/000186689>
- Müller, S. M., Galliardt, H., Schneider, J., Barisas, B. G., & Seidel, T. (2013). Quantification of Förster resonance energy transfer by monitoring sensitized emission in living plant cells. *Frontiers in Plant Science*, 4(October), 1–20. <https://doi.org/10.3389/fpls.2013.00413>
- Nair, N. P. V., Ahmed, S. K., & Ng Ying Kin, N. M. K. (1993). Biochemistry and pharmacology of reversible inhibitors of MAO-A agents: Focus on moclobemide. *Journal of Psychiatry and Neuroscience*, 18(5), 214–225.
- Nakata, H., Kameyama, K., Kazuko, H., & Haga, T. (1994). Location of agonist-dependent-phosphorylation sites in the third intracellular loop of muscarinic acetylcholine receptors (m2 subtype). *European Journal of Biochemistry*, 220(1), 29–36. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1994.tb18595.x>
- Nehmé, R., Carpenter, B., Singhal, A., Strege, A., Edwards, P. C., White, C. F., Du, H., Grisshammer, R., & Tate, C. G. (2017). Mini-G proteins: Novel tools for studying GPCRs in their active conformation. *Plos One*, 1–26. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0175642.g001>
- Northup, J. K., Sternweis, P. C., Smige, M. D., Schleifer, L. S., Ross, E. M., & G., G. A. (1980). Purification of the regulatory component of adenylate cyclase. *Biochemical Society Transactions*, 77(11), 6516–6520. <https://doi.org/10.1042/bst009058p>
- Okashah, N., Wan, Q., Ghosh, S., Sandhu, M., Inoue, A., Vaidehi, N., & Lambert, N. A. (2019). Variable G protein determinants of GPCR coupling selectivity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(24), 12054–12059. <https://doi.org/10.1073/pnas.1905993116>
- Oldham, W. M., & Hamm, H. E. (2008). Heterotrimeric G protein activation by G-protein-coupled receptors. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 9(1), 60–71. <https://doi.org/10.1038/nrm2299>
- Panula, P., Chazot, P. L., Cowart, M., Gutzmer, R., Leurs, R., Liu, W. L. S., Stark, H., Thurmond, R. L., & Haas, H. L. (2015). International union of basic and clinical pharmacology. XC VIII. histamine receptors. *Pharmacological Reviews*, 67(3), 601–655. <https://doi.org/10.1124/pr.114.010249>

- Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G., & Cormier, M. J. (1992). Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 111(2), 229–233. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(92\)90691-H](https://doi.org/10.1016/0378-1119(92)90691-H)
- Preininger, A. M., Meiler, J., & Hamm, H. E. (2013). Conformational Flexibility and Structural Dynamics in GPCR-Mediated G Protein Activation : A Perspective. *Journal of Molecular Biology*, 425(13), 2288–2298. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2013.04.011>
- Qiao, A., Han, S., Li, X., Li, Z., Zhao, P., Dai, A., Chang, R., Tai, L., Tan, Q., Chu, X., Ma, L., Thorsen, T. S., Reedtz-Runge, S., Yang, D., Wang, M. W., Sexton, P. M., Wootten, D., Sun, F., Zhao, Q., & Wu, B. (2020). Structural basis of Gs and Gi recognition by the human glucagon receptor. *Science*, 367(6484), 1346–1352. <https://doi.org/10.1126/science.aaz5346>
- Rasmussen, Søren G.F., Choi, H. J., Fung, J. J., Pardon, E., Casarosa, P., Chae, P. S., Devree, B. T., Rosenbaum, D. M., Thian, F. S., Kobilka, T. S., Schnapp, A., Konetzki, I., Sunahara, R. K., Gellman, S. H., Pautsch, A., Steyaert, J., Weis, W. I., & Kobilka, B. K. (2011). Structure of a nanobody-stabilized active state of the β_2 adrenoceptor. *Nature*, 469(7329), 175–181. <https://doi.org/10.1038/nature09648>
- Rasmussen, Søren G.F., Devree, B. T., Zou, Y., Kruse, A. C., Chung, K. Y., Kobilka, T. S., Thian, F. S., Chae, P. S., Pardon, E., Calinski, D., Mathiesen, J. M., Shah, S. T. A., Lyons, J. A., Caffrey, M., Gellman, S. H., Steyaert, J., Skinotis, G., Weis, W. I., Sunahara, R. K., & Kobilka, B. K. (2011). Crystal structure of the β_2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477(7366), 549–557. <https://doi.org/10.1038/nature10361>
- Roseberry, A. G., Bünemann, M., Elavunkal, J., & Hosey, M. M. (2001). Agonist-dependent delivery of M2 muscarinic acetylcholine receptors to the cell surface after pertussis toxin treatment. *Molecular Pharmacology*, 59(5), 1256–1268. <https://doi.org/10.1124/mol.59.5.1256>
- Rosenbaum, D. M., Rasmussen, S. G. F., & Kobilka, B. K. (2009). The structure and function of G-protein-coupled receptors. *Nature*, 459(7245), 356–363. <https://doi.org/10.1038/nature08144>
- Santos, R., Ursu, O., Gaulton, A., Bento, A. P., Donadi, R. S., Bologa, C. G., Karlsson, A., Al-Lazikani, B., Hersey, A., Oprea, T. I., & Overington, J. P. (2017). A comprehensive map of molecular drug targets. *Nature Reviews Drug Discovery*, 16(1), 19–34. <https://doi.org/10.1038/nrd.2016.230>
- Senarath, K., Kankanamge, D., Samaradivakara, S., Ratnayake, K., Tennakoon, M., & Karunarathne, A. (2018). Regulation of G Protein $\beta\gamma$ Signaling. In *International Review of Cell and Molecular*

- Biology* (1st ed., Vol. 339). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.02.008>
- Sente, A., Peer, R., Srivastava, A., Baidya, M., Lesk, A. M., Balaji, S., Shukla, A. K., Babu, M. M., & Flock, T. (2018). Molecular mechanism of modulating arrestin conformation by GPCR phosphorylation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 25(6), 538–545. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0071-3>
- Siehl, S. (2009). Regulation of RhoGEF proteins by G12/13-coupled receptors. *British Journal of Pharmacology*, 158(1), 41–49. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2009.00121.x>
- Simon, M. I., Strathmann, M. P., & Gautam, N. (1991). Diversity of G proteins in signal transduction. *Science*, 252(5007), 802–808. <https://doi.org/10.1126/science.1902986>
- Stauch, B., & Cherezov, V. (2018). Serial Femtosecond Crystallography of G Protein–Coupled Receptors. *Annual Review of Biophysics*, 47(1), annurev-biophys-070317-033239. <https://doi.org/10.1146/annurev-biophys-070317-033239>
- Stevens, R. C., Cherezov, V., Katritch, V., Abagyan, R., Kuhn, P., Rosen, H., & Wüthrich, K. (2013). The GPCR Network: A large-scale collaboration to determine human GPCR structure and function. *Nature Reviews Drug Discovery*, 12(1), 25–34. <https://doi.org/10.1038/nrd3859>
- Sunahara, R. K., Dessauer, C. W., & Gilman, A. G. (1996). Complexity and diversity of mammalian adenylyl cyclases. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 36, 461–480. <https://doi.org/10.1146/annurev.pa.36.040196.002333>
- Syrovatkin, V., Alegre, K. O., Dey, R., & Huang, X. Y. (2016). Regulation, Signaling, and Physiological Functions of G-Proteins. *Journal of Molecular Biology*, 428(19), 3850–3868. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.08.002>
- Tate, C. G. (2012). A crystal clear solution for determining G-protein-coupled receptor structures. *Trends in Biochemical Sciences*, 37(9), 343–352. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2012.06.003>
- Tate, C. G., & Schertler, G. F. (2009). Engineering G protein-coupled receptors to facilitate their structure determination. *Current Opinion in Structural Biology*, 19(4), 386–395. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2009.07.004>
- Thal, D. M., Sun, B., Feng, D., Nawaratne, V., Leach, K., Felder, C. C., Bures, M. G., Evans, D. A., Weis, W. I., Bachhawat, P., Kobilka, T. S., Sexton, P. M., Kobilka, B. K., & Christopoulos, A. (2016). Crystal structures of the M1 and M4 muscarinic acetylcholine receptors. *Nature*, 531(7594), 335–340. <https://doi.org/10.1038/nature17188>
- Tiligada, E., & Ennis, M. (2020). Histamine pharmacology: from Sir Henry Dale to the 21st century.

- British Journal of Pharmacology*, 177(3), 469–489. <https://doi.org/10.1111/bph.14524>
- Touhara, K. K., & Mackinnon, R. (2018). Molecular basis of signaling specificity between GIRK channels and GPCRs. *ELife*, 7, 1–23. <https://doi.org/10.7554/eLife.42908>
- Vilardaga, J. P., Bünemann, M., Krasell, C., Castro, M., & Lohse, M. J. (2003). Measurement of the millisecond activation switch of G protein-coupled receptors in living cells. *Nature Biotechnology*, 21(7), 807–812. <https://doi.org/10.1038/nbt838>
- Wang, J., Hua, T., & Liu, Z. J. (2020). Structural features of activated GPCR signaling complexes. *Current Opinion in Structural Biology*, 63, 82–89. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2020.04.008>
- Wang, W., Qiao, Y., & Li, Z. (2018). New Insights into Modes of GPCR Activation. *Trends in Pharmacological Sciences*, 39(4), 367–386. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2018.01.001>
- Warne, T., Edwards, P. C., Dorfe, A. S., Leslie, A. G. W., & Tate, C. G. (2019). Molecular basis for high-affinity agonist binding in GPCRs. *Science*, 778(May), 775–778. <https://doi.org/10.1126/science.aau5595>
- Wedegaertner, P. B., Wilson, P. T., & Bourne, H. R. (1995). Lipid Modifications of Trimeric G Proteins. *Journal of Biological Chemistry*, 270(2), 503–506.
- Wess, J., Eglen, R. M., & Gautam, D. (2007). Muscarinic acetylcholine receptors: Mutant mice provide new insights for drug development. *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(9), 721–733. <https://doi.org/10.1038/nrd2379>
- Wettschureck, N., & Offermanns, S. (2005). Mammalian G proteins and their cell type specific functions. *Physiological Reviews*, 85(4), 1159–1204. <https://doi.org/10.1152/physrev.00003.2005>
- Wolters, V., Krasel, C., Brockmann, J., & Bunemann, M. (2014). Influence of Gaq on the Dynamics of M3-Acetylcholine Receptor-G-Protein-Coupled Receptor Kinase 2 Interaction. *Molecular Pharmacology*, 87(1), 9–17. <https://doi.org/10.1124/mol.114.094722>
- Zhou, Q., Yang, D., Wu, M., Guo, Y., Guo, W., Zhong, L., Cai, X., Dai, A., Jang, W., Shakhnovich, E., Liu, Z. J., Stevens, R. C., Lambert, N. A., Babu, M. M., Wang, M. W., & Zhao, S. (2019). Common activation mechanism of class a GPCRs. *ELife*, 8, 1–31. <https://doi.org/10.7554/eLife.50279>

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 GPCRs in Physiologie und Pathologie.....	2
Abb. 2 Proteinfamilien als Arzneimittelzielstruktur	3
Abb. 3 GPCRs als Arzneimittelzielstruktur	3
Abb. 4 Phylogenetischer Baum und Klassifizierung von GPCRs.....	4
Abb. 5 Schematische Darstellungen eines GPCRs.....	5
Abb. 6 Anzahl an veröffentlichten GPCR Strukturen.....	6
Abb. 7 Struktur des β_2 AR-Gs Komplexes	6
Abb. 8 Diversität von GPCR Strukturen verschiedener Klassen	6
Abb. 9 Aktivierung des M_2 Rezeptors	7
Abb. 10 Liganden-abhängige Rezeptoraktivierung	8
Abb. 11 Kopplungspräferenzen von muskarinergen Rezeptoren	8
Abb. 12 Inaktive Strukturen des M_2 - und M_3 -Rezeptors.....	8
Abb. 13 Signaltransduktion in G-Protein-gekoppelten Rezeptoren	10
Abb. 14 G-Protein-Kopplung von vier verschiedenen Klassen an $G\alpha$ -Untereinheiten	11
Abb. 15 Phylogenetische Beziehung humaner $G\alpha$ -UE.....	11
Abb. 16 Struktur der $G\alpha$ -Untereinheit (farblich von N- nach C-Terminus)	12
Abb. 17 Kreislauf der G-Protein-Aktivierung	13
Abb. 18 G-Protein-Signalwege für G_s , G_i/o , $G_{12/13}$ und $G_{q/11}$	15
Abb. 19 Evolution der G-Protein-Kopplung.....	16
Abb. 20 ICL2 vermittelte G-Protein-Interaktionen des Glucagon-Rezeptors	17
Abb. 21 Bindung von C-terminal modifizierten $G\alpha$ -Chimären an GPCRs	18
Abb. 22 PCR-Schema	43
Abb. 23 Agarose-Gel unter UV-Licht.....	45
Abb. 24 Ligation.....	46
Abb. 25 Inkubierte Agar-Platte	49
Abb. 26 Prinzip eines Gibson-Assemblys.....	55
Abb. 27 Primerdesign eines typischen Gibson-Assemblys.....	56
Abb. 28 Primerdesign eines Gibson-Assemblys für kurze DNA-Modifikationen.....	57
Abb. 29 FRET-Effizienz	58
Abb. 30 Orientierung von Donor- und Akzeptorfluorophoren.....	59
Abb. 31 Spektrale Überlappung	59
Abb. 32 Fluorophor-Spektren	60
Abb. 33 Falschanregung und Durchbluten in den YFP-Kanal	61
Abb. 34 Aufbau des Fluoreszenz-Mikroskops	62
Abb. 35 Einzelfluoreszenz-Emissionen	63
Abb. 36 Repräsentative FRET-Kurve.....	63
Abb. 37 G-Protein-Bindungsassay in permeabilisierten Zellen	65

Abb. 38 FRET-Kurven des G-Protein-Bindungsassays	66
Abb. 39 Indirekter G-Protein-Aktivierungsassay (GRK2-Rekrutierung durch Gβγ)	67
Abb. 40 Repräsentative Kurven der indirekten G-Protein-Aktivierung	68
Abb. 41 Repräsentative Konzentrations-Wirkungskurven der G-Protein-Aktivierung	68
Abb. 42 Maximale Amplituden der Gq- / Go-Aktivierung gegenüber endogenen G-Proteinen	69
Abb. 43 Direkter G-Protein-Aktivierungsassay in intakten Zellen	70
Abb. 44 Repräsentative Kurven der direkten G-Protein-Aktivierung	71
Abb. 45 Stabilität der Bindung von GoqC-Konstrukten an den M ₃ R	73
Abb. 46 Stabilität der Bindung von GqoC11 an den M ₃ R	74
Abb. 47 Gestörte Bindung von GqoC22 an den M ₃ R	74
Abb. 48 Aktivierung von GoqC-Konstrukten durch den M ₃ R	75
Abb. 49 PTX-unterdrückte Aktivierung von Gi/o-Proteinen	76
Abb. 50 Aktivierung von GqoC-Konstrukten durch den M ₃ R	76
Abb. 51 Verhinderte Aktivierung von GqoC22 mit dem M ₃ R	77
Abb. 52 Direkte G-Protein-Aktivierungsmessung mit dem M ₃ R	77
Abb. 53 Schematische Struktur von Gao	78
Abb. 54 Snake-Plot von Gao	78
Abb. 55 Lokalisation chimärer Strukturen auf der Gα-Oberfläche	79
Abb. 56 Stabilität der Bindung von GoqN-Konstrukten an den M ₃ R	80
Abb. 57 Stabilität der Bindung von Goq2-Konstrukten an den M ₃ R	81
Abb. 58 Stabilität der Bindung von GoqN+2 an den M ₃ R	81
Abb. 59 Aktivierung von GoqN-Konstrukten durch den M ₃ R	82
Abb. 60 Einfluss von PTX auf die Aktivierung von GoqN+C22	82
Abb. 61 Aktivierung von Goq2-Konstrukten durch den M ₃ R	83
Abb. 62 Vergleich der Bindungsstabilität zwischen Goq1- und GoqN-Konstrukten an den M ₃ R	84
Abb. 63 Vergleich der Aktivierung zwischen Goq1- und GoqN-Konstrukten durch den M ₃ R	84
Abb. 64 Stabilität der Bindung von Goq4-Konstrukten an den M ₃ R	85
Abb. 65 Aktivierung von Goq4-Konstrukten durch den M ₃ R	85
Abb. 66 Schematische Struktur von Gaq	86
Abb. 67 Snake-Plot von Gaq	87
Abb. 68 Lokalisation chimärer Strukturen auf der Gα-Oberfläche	87
Abb. 69 Stabilität der Bindung von GqoN-Konstrukten an den M ₃ R	88
Abb. 70 Stabilität der Bindung von Gqo2-Konstrukten an den M ₃ R	88
Abb. 71 Aktivierung von GqoN-Konstrukten durch den M ₃ R	89
Abb. 72 Aktivierung von Gqo2-Konstrukten durch den M ₃ R	89
Abb. 73 Gestörte Bindung von GqoC22 Doppelchimären an den M ₃ R	90
Abb. 74 Aktivierung von GqoC22 Doppelchimären durch den M ₃ R	90
Abb. 75 Stabilität der Bindung von Gqo4-Konstrukten an den M ₃ R	90
Abb. 76 Aktivierung von Gqo4-Konstrukten durch den M ₃ R	91

Abb. 77 Stabilität der Bindung von GoqC-Konstrukten an den H ₁ R	92
Abb. 78 Stabilität der Bindung von GoqN-Konstrukten an den H ₁ R.....	93
Abb. 79 Stabilität der Bindung von Goq2-Konstrukten an den H ₁ R.....	93
Abb. 80 Stabilität der Bindung von GqoC-Konstrukten an den H ₁ R	94
Abb. 81 Gestörte Bindung von GqoC22 an den H ₁ R	94
Abb. 82 Stabilität der Bindung von Gqo2-Konstrukten an den H ₁ R.....	95
Abb. 83 Gestörte Bindung und Aktivierung von GqoN-Konstrukten am H ₁ R	96
Abb. 84 Aktivierung von GoqC-Konstrukten durch den H ₁ R	97
Abb. 85 Aktivierung von GoqN-Konstrukten durch den H ₁ R.....	98
Abb. 86 Aktivierung von Goq2-Konstrukten durch den H ₁ R.....	98
Abb. 87 Aktivierung von GqoC-Konstrukten durch den H ₁ R	99
Abb. 88 Aktivierung von Gqo2-Konstrukten durch den H ₁ R.....	99
Abb. 89 Stabilität der Bindung von Goq4-Konstrukten an den H ₁ R.....	100
Abb. 90 Aktivierung von Goq4-Konstrukten durch den H ₁ R.....	100
Abb. 91 Stabilität der Bindung von Gqo4-Konstrukten an den H ₁ R.....	101
Abb. 92 Aktivierung von Gqo4-Konstrukten durch den H ₁ R.....	101
Abb. 93 Übersicht der G-Protein-Bindungsexperimente mit M ₃ R und H ₁ R.....	102
Abb. 94 Übersicht der G-Protein-Aktivierungsexperimente mit M ₃ R und H ₁ R	103
Abb. 95 Punktmutationen im M ₃ R.....	104
Abb. 96 Sequenz-Alignment der muskarinergen Rezeptoren	104
Abb. 97 Stabilität der Bindung von Go und Gq an M ₃ R-TM3 / ICL2-Mutanten	105
Abb. 98 Stabilität der Bindung von Go und Gq an M ₃ R-TM5-Mutanten.....	105
Abb. 99 Stabilität der Bindung von Go und Gq an M ₃ R-TM6-Mutanten.....	106
Abb. 100 Stabilität der Bindung von Go und Gq an M ₃ R-TM6-Mutanten	106
Abb. 101 Deletion des ICL3 im M ₃ R.....	107
Abb. 102 Stabilität der Bindung von Go und Gq an M ₃ R-mit deletiertem ICL3 (M ₃ R ΔICL3)	108
Abb. 103 Chimärer Austausch des ICL3 im M ₃ R durch den vom M ₂ R (M ₃ ICL3M ₂)	108
Abb. 104 Stabilität der Bindung von Go und Gq an den chimären M ₃ ICL3M ₂ -Rezeptor	109
Abb. 105 Chimärer Tausch der Helix 8 in M ₃ R durch den von M ₂ R (M ₃ H8M ₂ / M ₂ H8M ₃)	110
Abb. 106 Stabilität der Bindung von Go und Gq an den chimären M ₃ H8M ₂ -Rezeptor	111
Abb. 107 Stabilität der Bindung von Go und Gq an den chimären M ₂ H8M ₃ -Rezeptor	111

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Laborgeräte	22
Tabelle 2 Mikroskop („Visitron-Setup“)	23
Tabelle 3 Verbrauchsmaterialien.....	24
Tabelle 4 Allgemeine Reagenzien.....	25
Tabelle 5 Reagenzien, Enzyme und Kits für Klonierungen.....	26
Tabelle 6 Reagenzien und Kits für die Zellkultur.....	26
Tabelle 7 Liste von allgemeinen Plasmiden.....	27
Tabelle 8 Chimäre Gα-Konstrukte	28
Tabelle 9 Chimäre GPCR-Konstrukte.....	28
Tabelle 10 Punktmutierte M ₃ R-Konstrukte.....	29
Tabelle 11 PCR-Primer (DNA-Oligonukleotide)	35
Tabelle 12 DMEM-Supplementation.....	36
Tabelle 13 Stammlösungen.....	36
Tabelle 14 Rezeptur: externer Puffer	37
Tabelle 15 Rezeptur: interner Puffer	37
Tabelle 16 Rezeptur: KCM-Puffer.....	38
Tabelle 17 Rezeptur: LB-Medium (flüssig)	38
Tabelle 18 Rezeptur: LB-Agar (fest)	38
Tabelle 19 Rezeptur: Ampicillin 1000x.....	39
Tabelle 20 Rezeptur: Kanamycin 1000x.....	39
Tabelle 21 Rezeptur: TAE-Puffer 50x.....	39
Tabelle 22 Zellkulturkalender für FRET-Experimente.....	40
Tabelle 23 Rezeptur: PCR.....	42
Tabelle 24 PCR-Protokolle.....	43
Tabelle 25 Rezeptur: Restriktionsverdau	44
Tabelle 26 Rezeptur: Ligation	46
Tabelle 27 Rezeptur: Transformation chem. kompetenter <i>E. coli</i> mit KCM-Puffer.....	48
Tabelle 28 Rezeptur: Transformation superkompetenter <i>E. coli</i> mit Hitzeschock	49
Tabelle 29 Rezeptur: Lösungen für DNA-Präparationen.....	52
Tabelle 30 Prozedur: Punktmutationen.....	53
Tabelle 31 Prozedur: Subklonierung.....	54
Tabelle 32 Rezeptur: Gibson-Assembly	57
Tabelle 33 Transfektionsprotokoll für den G-Protein-Bindungsassay	64
Tabelle 34 Transfektionsprotokoll für die GRK2-Rekrutierung durch Gβγ.....	67
Tabelle 35 Transfektionsprotokoll für den direkten G-Protein-Aktivierungsassay.....	69

Danksagungen

Als Erstes möchte ich mich ganz besonders bei meinem Doktorvater *Prof. Moritz Bünemann* dafür bedanken, dass Sie mir die Möglichkeit gegeben haben, an diesem interessanten Thema zu forschen und ich dadurch einige spannende FRET-Assays sowie viele molekularbiologische Methoden in Ihrem Labor erlernen durfte. Außerdem möchte ich Ihnen für die intensive Betreuung während der letzten Jahre danken, für die Sie sich auch dann noch Zeit genommen haben, wenn Sie eigentlich keine hatten. Vielen Dank, dass Ihre (geschlossene) Tür immer offenstand und Sie mich mit Ihrer freundlichen und konstruktiven Art wiederaufgebaut haben, wenn die Experimente mal nicht wie geplant funktionierten und Sie trotzdem noch einen Sinn darin gesehen haben.

Danke auch an *Prof. Kockskämper*, *Prof. Culmsee* und *Prof. Kolb* für die hilfreichen Vorschläge während meiner „Progress-Reports“.

Außerdem möchte ich mich auch bei allen aktuellen und ehemaligen *Kollegen* bedanken, da Ihr jeden Tag aufs Neue für eine tolle Arbeitsatmosphäre, großartiges Teamwork und auch einen guten Wissensaustausch untereinander gesorgt habt. Ich möchte außerdem allen für die schönen gemeinsamen Institutsausflüge wie das Riesenschlauchbootpaddeln oder die Alpakawanderung danken, die Ihr zu unvergesslichen Erlebnissen gemacht habt.

Danke *Sina*, *Olga*, *Nadja*, *Michael* und *Cornelius* für die tollen gemeinsamen Momente auf den Konferenzen, von denen mir ganz besonders die spontane Sightseeing-Tour auf dem Hinweg nach Nottingham in Erinnerung bleibt (Danke *Cornelius*, dass du uns herumgefahren und uns viele schöne Dinge in England gezeigt hast!).

Vielen Dank *Cornelius* für Deine vielen Antworten auf alle fachlichen oder sonstigen Fragen. Deine Unterstützung hat mir nicht nur bei so manchen Klonierungen geholfen, auch die netten Gespräche und Tipps, wie z.B. zu den schönsten Reisezielen im Westen der USA, haben mir viel bedeutet. Ganz besonders entscheidend für diese Arbeit war auch deine Idee, die Dissoziationskinetiken mit Hilfe der AUC zu quantifizieren, was mir die Auswertung erleichtert hat.

Danke *Michael*, dass Du schon in meinen ersten beiden Wochen als Doktorand dafür gesorgt hast, dass ich mich „wie zu Hause“ gefühlt habe. Unvergessen wird auch das Skiwochenende mit dem Institut in Hochfügen bleiben, das wir im „Crystal-Hotel“ verbringen durften bzw. mussten ;-).

Danke an die ganze „Mensagang“, *Cornelius, Michael, Julia, Fabian, Lukas, Uri, Stephan* und viele andere für die gemeinsamen mittäglichen Spaziergänge und die vielen netten Gespräche.

Danke *Susen*, dass du nicht nur für Ordnung im Labor sorgst, sondern auch überall wo du bist Fröhlichkeit und gute Laune verbreitest. Und für irgendwelche „Neuigkeiten“ bist du natürlich die beste Ansprechpartnerin :-).

Danke *Emma* für die allgemeine Organisation, das Korrekturlesen des Manuskripts und vor allem deine liebenswerte und manchmal sarkastische Art, die immer für gute Stimmung gesorgt hat.

Danke *Sandra* für die ganze Organisation im Labor und besonders für deine pragmatische Hilfe bei Problemen jeglicher Art.

Danke an alle meine *Wahlpflichtpraktikanten* für die gemeinsamen (und meistens erfolgreichen) Projekte und vor allem *Katha*, die sich trotzdem nicht von mir hat abschrecken lassen, jetzt bei uns zu promovieren ;-).

Vielen Dank an *alle Freunde*, die mich in den stressigen Phasen auch mal zur Erholung „gezwungen“ haben, sei es für einen gemeinsamen Abend oder für eine Runde Trimm-Dich-Pfad.

Ich möchte auch meinen *Eltern* danken, die mich seit meiner Kindheit bei allem unterstützt haben, damit ich diesen Weg einschlagen konnte. Danke auch an meine Schwester *Anja*, die mir durch ihre Erfahrungen in der Nachbararbeitsgruppe schon frühzeitig die tolle Arbeitsatmosphäre in diesem Institut schmackhaft gemacht hat und mich in meiner Entscheidung bestärkt hat, dort zu promovieren.

Zuletzt möchte ich mich ganz besonders bei meiner Freundin *Nadja* bedanken, dass Du mir gerade in der stressigen Zeit zu Hause immer den Rücken freigehalten hast. Danke auch für das Korrekturlesen, das Aufbauen, wenn ich mal ein Tief hatte und jegliche andere Unterstützung, die ich gebraucht habe. Ich kann mich immer auf Dich verlassen.

Lebenslauf

Zum Schutz personenbezogener Daten steht der Lebenslauf in der Online-Version nicht zur Verfügung.